

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

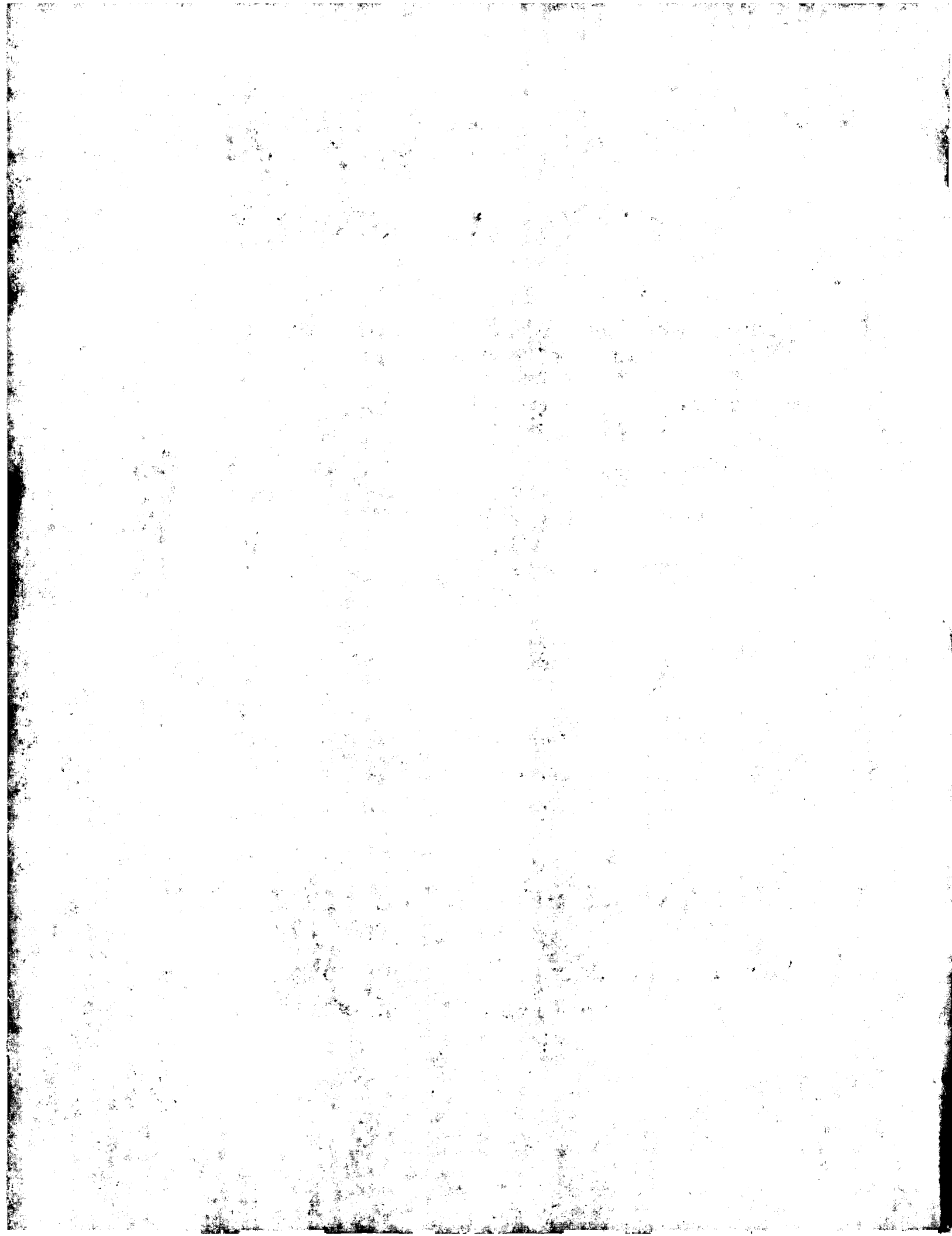
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



09/402093

PCT/JP 99/00406

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

08.03.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 1月30日

出 願 番 号

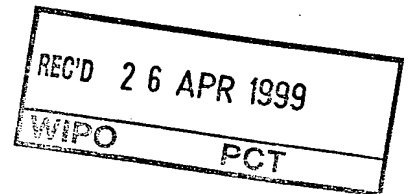
Application Number:

平成10年特許願第032272号

出 願 人

Applicant(s):

サントリー株式会社

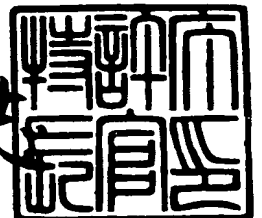


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3021186

【書類名】 特許願

【整理番号】 983082

【提出日】 平成10年 1月30日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N-15/09

【発明の名称】 補助ペプチドを用いたペプチドの製造方法

【請求項の数】 23

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2 7 1 6 番地
1 サントリ株式会社 医薬センター内

【氏名】 大末 和廣

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2 7 1 6 番地
1 サントリ株式会社 医薬センター内

【氏名】 簗田 雅之

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2 7 1 6 番地
1 サントリ株式会社 医薬センター内

【氏名】 鈴木 雄司

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【書類名】 明細書

【発明の名称】 補助ペプチドを用いたペプチドの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的の生物学的活性を有するペプチドの製造方法であって、

工程（1）；補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は補助ペプチドが付加された目的ペプチドにさらに保護ペプチドが付加された融合蛋白質、をコードする塩基配列を有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から前記補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取する工程；

工程（2）；工程（1）で融合蛋白質を得た場合、当該融合蛋白質から補助ペプチドが付加された目的ペプチドと保護ペプチドを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；

工程（3）；目的ペプチドに修飾が必要な場合、工程（1）又は工程（2）で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドに修飾反応を施す工程；

工程（4）；工程（1）、工程（2）又は工程（3）で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドから、補助ペプチドと目的ペプチドを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；並びに

工程（5）；工程（4）で得られた目的ペプチドを精製する工程；
を含んで成る方法。

【請求項2】 前記補助ペプチドが5～50のアミノ酸残基を有することを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 前記補助ペプチドが付加された目的ペプチドの等電点が8～12であることを特徴とする請求項1又は2記載の製造方法。

【請求項4】 前記目的ペプチドが200以下のアミノ酸残基を有することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項5】 前記保護ペプチドが30～200のアミノ酸残基を有することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項6】 補助ペプチドが付加された目的ペプチドを精製する工程において、イオン交換樹脂を用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記

載の製造方法。

【請求項 7】 イオン交換樹脂が陽イオン交換樹脂であることを特徴とする請求項 6 記載の製造方法。

【請求項 8】 目的ペプチドの溶解性を維持するために工程 (1) ~ (5) の少なくとも 1 つの工程において界面活性剤及び／又は塩を添加することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 9】 宿主細胞が原核細胞又は真核細胞であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 10】 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする請求項 9 記載の製造方法。

【請求項 11】 目的ペプチドがアミド化ペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 12】 目的ペプチドが GLP-1 であることを特徴とする請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 13】 補助ペプチドが付加された GLP-1 [G] の等電点が 8 ~ 12 であることを特徴とする請求項 12 記載の製造方法。

【請求項 14】 精製工程においてイオン交換樹脂を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 15】 イオン交換樹脂が陽イオン交換樹脂であることを特徴とする請求項 14 記載の製造方法。

【請求項 16】 精製工程に疎水性クロマトグラフィーを用いること特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 17】 目的ペプチドの溶解性を維持するために界面活性剤及び／又は塩を添加することを特徴とする請求項 11 ~ 16 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 18】 得られた GLP-1 の純度が 98 % 以上であることを特徴とする請求項 12 記載の製造方法。

【請求項 19】 エンドトキシンの含有量が 0.03 ユニット / mg 以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 20】 請求項 18 又は 19 記載の GLP-1 を有効成分とする糖尿病治療用医薬組成物。

【請求項 21】 補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は補助ペプチドが付加された目的ペプチドにさらに保護ペプチドが付加された融合蛋白質をコードする塩基配列を有する発現ベクター。

【請求項 22】 補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は補助ペプチドが付加された目的ペプチドにさらに保護ペプチドが付加された融合蛋白質をコードする塩基配列を有する発現ベクターで形質転換された原核又は真核宿主細胞。

【請求項 23】 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする請求項 10 記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は遺伝子組換え技術を用いたペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

多くの生理活性ペプチドが遺伝子組み換え技術を用いて微生物や動物細胞などを宿主として生産されている。目的ペプチドの生産方法としては細胞外に分泌させる方法、細胞内に目的ペプチドの N 末端から発現させる、いわゆる直接発現法、また、目的ペプチドの N 末端もしくは C 末端に保護ペプチドを付加した融合蛋白質発現方法等が知られている。目的ペプチドは上記の方法等により、細胞内又は外に発現され、化学的もしくは酵素的な切断や修飾を経て、目的ペプチドを生成させ、精製工程により純化され、目的ペプチドを得るという方法が行われている。

【0003】

一般的に、低分子量のペプチドを生産するには、細胞内に存在する蛋白分解酵素による分解を避けるため、上記の融合蛋白質発現法が使われている。この場合、目的ペプチドと保護ペプチドの間に、目的ペプチドを化学的あるいは酵素反応を用いて切断させるようにデザインした切断部位領域を付加した融合蛋白質を細

胞内に発現させた後、化学的もしくは酵素的方法により融合蛋白から目的ペプチドを切断し、目的ペプチドを沈澱やクロマトグラフィー工程を経て単離精製を行う方法が行われている。

【0004】

更に、カルシトニンのようなC末端がアミド化されたペプチドが目的ペプチドの場合は、当該ペプチドに係るアミノ酸配列のC末端部位にグリシンを付加したペプチドを融合蛋白の一部として発現させ、蛋白分解酵素により融合蛋白から目的のグリシン付加ペプチドを切断させた後、修飾酵素であるアミド化酵素を作用させ、アミド化ペプチドを生成し、精製工程を経て目的のアミド化ペプチドが生産されている。

【0005】

しかしながら、工業的スケールで様々なペプチドを生産しようとする際には、種々の切断及び修飾反応条件下における目的ペプチドの溶解性やゲル化の問題、カラムクロマトグラフィー工程においてカラムに負荷する試料濃度、カラムからの溶出条件及び溶出後の安定性等に関して問題が生じる場合があり、その原因は目的ペプチドの物理化学的な諸性質によるところが大きい。

【0006】

例えば、グルカゴン様ペプチド-1 (7-36) アミド (Glucagon-Like Peptide-1 (7-36) amide; 以下、GLP-1)の製法の例が挙げられる。GLP-1 は、小腸で産生され、膵臓のベータ細胞に作用しインシュリンの分泌を促進する作用などを有するC末端がアミド化された30アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり (Mojsow, S.等 J. Clin. Invest. 79, 616-619, 1987)、近年、その薬理作用から糖尿病治療薬の可能性が示唆されている (Gutniak MK, 等, New England Medicine, 326 1316-1322, 1992)。

【0007】

GLP-1 の製法としては上記のような従来技術に基づき大腸菌等を宿主とした融合蛋白質発現法により製造する場合が考えられる。当該製法を用いる場合、後のアミド化修飾反応のためにアミド化酵素の基質としてGLP-1 [Gly] (GLP-1 のアミノ酸配列のC末端にグリシンが付加されたものでGLP-1 (7-37) とも記載される場

合があるが、以下GLP-1 [G] と称する) を製造中間体ペプチドとして発現させる。この場合、GLP-1 [G] のN末端部位又はC末端部位に化学的あるいは酵素的に融合蛋白からGLP-1 [G] を切り出すための切断部位領域を介して保護ペプチドを付加した融合蛋白として発現させ、その後、化学的又は酵素的に融合蛋白からGLP-1 [G] を切り出し、得られたGLP-1 [G] をアミド化酵素を用いてアミド化反応を行い目的のGLP-1 を製造することができる。

【0008】

しかしながら、上記の方法により製造する場合でも以下に示すような問題が生じるために未だ工業レベルで安価に供給できる製造法は確立されておらず、その製造法の確立が望まれている。

アミド化酵素反応の至適 pH は弱酸性から中性付近であるが、GLP-1 [G] 及びGLP-1 の理論上の等電点はそれぞれ $pI=5.5$ 及び $pI=7.5$ である。従って、アミド化酵素至適 pH 条件でGLP-1 [G] への酵素反応を行うと基質であるGLP-1 [G] の等電点に反応液の pH が近接しているため、GLP-1 [G] の等電点沈殿を形成しやすいと考えられる。

【0009】

更に、GLP-1 [G] が沈殿することで生成されたGLP-1 も共沈し、酵素反応が十分進行しない可能性があり製造上問題である。更に、GLP-1 [G] 及びGLP-1 は処理（ハンドリング）する際にカラム工程で凝集を起こし、カラム中でゲル化を起こしやすいペプチドであるため、精製上も問題が生じる場合がある。

上記のような問題はどれも工業的スケールでGLP-1 を製造する場合に、回収率及び工程管理ひいては製造コスト上の面で非常に問題になる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、工業的スケールでの遺伝子組換え技術を用いて目的ペプチドを効率よく生産する際に、目的ペプチド自体が有する物理化学的性質のために生じる問題（例えば当該ペプチドの生産工程上の化学反応的又は酵素反応的処理あるいは精製工程における低溶解性とゲル化の問題）を改善して目的ペプチドを効率的に生産する方法を提供することを目的とする。

なお、本発明に係る目的ペプチドとは、最終的に得ようとしているペプチドだけでなく、その製造過程において必要な製造中間体ペプチドも意味する。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは先に述べた問題を回避するために、目的ペプチドに補助ペプチドを付加することにより目的ペプチドが有する問題点を解消して、目的ペプチドを効率よく製造する方法を見出した。即ち、本発明に係るペプチドの製造方法は、目的の生物学的活性を有するペプチドを製造する方法であって、以下の工程；

工程（１）；補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は補助ペプチドが付加された目的ペプチドにさらに保護ペプチドを付加した融合蛋白質、をコードする塩基配列を有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から前記補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取する工程；

工程（２）；工程（１）で融合蛋白質を得た場合、当該融合蛋白質から補助ペプチドが付加された目的ペプチドと保護ペプチドを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；

工程（３）；目的ペプチドに修飾が必要な場合、工程（１）又は工程（２）で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドに修飾反応を施す工程、

工程（４）；工程（１）、工程（２）又は工程（３）で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドから、補助ペプチドと目的ペプチドを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；並びに

工程（５）；工程（４）で得られた目的ペプチドを精製する工程；
を含んでなる当該製造方法である（図１）。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明に係る補助ペプチドとは、目的ペプチド自体の物理化学的性質に由来する工業的製造上の問題を回避するために用いるペプチドである。目的ペプチド自体の物理化学的性質に由来する製造上の問題のうち、当該ペプチドの製造工程上の化学反応的又は酵素反応的处理及び精製上の問題、例えば、種々の切断及び修

飾反応条件下における目的ペプチドの溶解性やゲル化の問題、またカラムクロマトグラフィー工程におけるカラムに負荷する試料濃度、カラムからの溶出条件及び溶出後の安定性等に関する問題が特に注目される。

【0013】

当該補助ペプチドは目的ペプチドが有している物理化学的性質に応じて適宜作製することができ、例えば目的ペプチドの等電点が中性～弱酸性であり、且つ製造工程上の至適pHも中性～弱酸性でありこのようなpHのもとでは目的ペプチドの溶解度が低すぎる場合には、補助ペプチドが付加した目的ペプチドの等電点 (pI) が8～12となるように補助ペプチドを設計することが望ましく、9～11に設計することが好ましい。また、当該ペプチドの大きさ (長さ) は5～50のアミノ酸残基を有するものが好ましく、更に好ましくは5～30アミノ酸残基以下を有することであるが、塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸を少なくとも1つ以上含む。

【0014】

本発明により生産することができる目的ペプチドは特に限定されるものではないが、上述のGLP-1の他にも200アミノ酸残基以下のアミノ酸配列を有するペプチドの製法に好適である。そのようなペプチドの例としては、副腎皮質刺激ホルモン (Adrenocorticotrophic hormone)、アドレノメデュリン (Adrenomedullin)、アミリン (Amylin)、アンジオテンシン (Angiotensin) I、アンジオテンシン (Angiotensin) II、アンジオテンシン (Angiotensin) III、A型ナトリウム利尿ペプチド (A-type Natriuretic Peptide)、B型ナトリウム利尿ペプチド (B-type Natriuretic Peptide)、ブラジキニン (Bradykinin)、ビッグガストリン (Big Gastrin)、カルシトニン (Calcitonin)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene related peptide)、コレシストキニン (Cholecystokinin)、

【0015】

コルチコトロピン放出因子 (Corticotropin Releasing Factor)、コルチスタチン (Cortistatin)、C型ナトリウム利尿ペプチド (C-type Natriuretic Peptide)、デフェシン (Defesin) 1、デルタ・スリープ・インデュースングペプチド (Delta Sleep-Inducing Peptide)、ダイノルフィン (Dynorphin)、エラフィン (Elafin)

、 α -エンドルフィン (α -Endorphin)、 β -エンドルフィン (β -Endorphin)、 γ -エンドルフィン (γ -Endorphin)、エンドセリン-1 (Endothelin-1)、エンドセリン-2 (Endothelin-2)、エンドセリン-3 (Endothelin-3)、ビッグエンドセリン-1 (Big Endothelin-1)、ビッグエンドセリン-2 (Big Endothelin-2)、ビッグエンドセリン-3 (Big Endothelin-3)、エンケファリン (Enkephalin)、ガラニン (Galanin)、ガストリン (Gastrin)、GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide)、ガストリン放出ペプチド (Gastrin Releasing Peptide)、

【0016】

グルカゴン (Glucagon)、グルカゴン様ペプチド-2 (Glucagon-like peptide -2)、成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone Releasing Factor)、成長ホルモン (Growth Hormone)、グアニリン (Guanylin)、ウログアニリン (Uroguanylin)、ヒスタチン 5 (Histatin 5)、インシュリン (Insulin)、ジョイニングペプチド (Joining Peptide)、黄体ホルモン放出ホルモン (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)、黒色細胞刺激ホルモン (Melanocyte Stimulating Hormone)、ミドカイン (Midkine)、モチリン (Motilin)、ニューロキニン A (Neurokinin A)、ニューロキニン B (Neurokinin B)、ニューロメジン B (Neuromedin B)、ニューロメジン C (Neuromedin C)、ニューロペプチド Y (Neuropeptide Y)、ニューロテンシン (Neurotensin)、

【0017】

オキシトシン (Oxytocin)、プロアドレノメデュリン N-末端 20 ペプチド (Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide)、クロモグラニン A (Cromogranin A)、副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone)、PTH 関連ペプチド (PTH related peptide)、ペプチドヒスチジン-メチオニン-27 (Peptide Histidine-Methionin-27)、脳下垂体アデニレートサイクラーゼ活性化ポリペプチド 38 (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 38)、血小板因子-4 (Platelet Factor -4)、ペプチド T (Peptide T)、セクレチン (Secretin)、血清胸腺因子 (Serum Thymic Factor)、ソマトスタチン (Somatostatin)、サブスタンス P (Substance P)、チロトロピン放出ホルモン (Thyrotropin Releasing Hormone)、ウロコルチン (Urocortin)、管活性腸ペプチド (Vasoactive Intestinal Peptide)、バソプ

レシン(Vasopressin) 及びこれらの誘導体等が挙げられる。

【0018】

目的ペプチドの例としてGLP-1 を挙げると、当該物質はアミド化ペプチドであるのでその製造中間体であるGLP-1 [G] を目的ペプチドとしてまず得る必要があり、具体的には、GLP-1 [G] に塩基性アミノ酸を有するアミノ酸を付加したペプチドをGLP-1 の生産に用いることができる。即ち、塩基性アミノ酸を含む補助ペプチドを付加することにより、GLP-1 [G] の等電点 (pI=5.5) をアルカリ側にシフトさせることができ、後のアミド化修飾反応の際にアミド化酵素反応液の pH において補助ペプチドがGLP-1 [G] に付加したペプチドの溶解性が増すために沈殿形成が抑えられ、収率及び収量を増加させることができる。また、塩基性アミノ酸を含む親水性補助ペプチドを用いることにより、目的ペプチドの溶解度を上昇させること、更にはGLP-1 [G] 及びGLP-1 の持つ凝集性を回避でき、精製工程において非常に有用である。

【0019】

また、補助ペプチドがGLP-1 [G] に付加したペプチドは pI 8~12 を有することが望ましく、当該ペプチドを陽イオン交換樹脂に作用させることにより、高収率 (98%以上) で当該ペプチドを得ることができる。

得られたペプチドから目的ペプチドを得るために、補助ペプチドと目的ペプチドとの間に化学的あるいは酵素的に切断できるような切断部位領域を導入する。当該切断部位領域についても目的ペプチドが有している物理化学的性質に応じて切断効率の高い切断部位領域を設定する。酵素的及び化学的な切断方法としては Methods in ENZYMOLOGY, 185巻, Gene Expression Technology (David V. Goeddel編集、出版社ACADEMIC PRESS, INC) に記載されている方法も用いることができる。

【0020】

化学的切断方法としては、メチオニンのC末端側をブロムシアンで切断する方法 (D.V. Goeddel et al, Proc. Natl. Acad.Sci. USA, Vol.76, p106-110, 1979)、-Asp-Pro- 配列の間を蟻酸で切断する方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.40, p1173, 1970)、-Asn-Gly- 配列の間をヒドロキシルアミンで切

断する方法及びトリプシンのC末端側をBNPS-スカトール又はN-クロロスクシンイミドで切断する方法等が挙げられる。例えば、目的ペプチドに係るアミノ酸配列中にメチオニンが含まれない場合は目的ペプチドに隣接する切断部位領域の末端にメチオニンを導入し、ブロムシアン処理により化学的に切断部位領域での切断を行うことができる。

【0021】

また、酵素的切断方法としては、切断処理に用いる酵素が基質として特異的に認識することができる切断部位領域を設定すれば良く、それらの例としては、X-Gly 又は Pro-X-Gly-Pro配列の-X-Gly- 配列の間をコラーゲナーゼ (Collagenase) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, p4692-4696, 1984) で、-Asp-Asp-Asp-Lys- 配列 (配列番号: 1) のLys のC末端側をエンテロキナーゼ (Enterokinase) で、-Ile-Glu-Gly-Arg- 配列 (配列番号: 2) のArg のC末端側を血液凝固因子Xa (blood coagulation Factor Xa) (特開昭61-135591) で、-Gly-Pro-Arg- 配列のArg のC末端側をトロンビン (Thrombin) (特開昭62-135500) で、-Arg- のC末端側をトリプシン (Trypsin) 又はクロストリパイン (Clostripain) で、Arg 又はLys のC末端側をエンドプロテアーゼ (endoprotease) Arg-C (Nature, Vol. 285, p456-461, 1980) で、Lys-Arg、Arg-Arg 又はPro-Arg 配列のC末端側をサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) Kex2 プロテアーゼ及びその誘導体 (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 144, p807-814, 1987、特開平1-199578) で、

【0022】

Lys のC末端側をリシル エンドペプチダーゼ (lysl endopeptidase) 又はエンドペプチダーゼ (endopeptidase) Lys-C (特開昭61-275222) で、Asp 又はGlu のC末端側をスタフィロコッカス・アウレウス (S. aureus) V8 プロテアーゼ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 69, p3506-3509, 1972) で、-Phe-Arg- 配列のC末端側をカリクレイン (Kallikrein) (特開昭62-248489) で、-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr- 配列 (配列番号: 3) のLeu-Leu の間をレニン (renin) で (特開昭60-262595)、-Glu-Gly-Arg- 配列のC末端側をウロキナーゼ (Urokinase) (特開平2-100685) で、Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 配列 (配列番号: 4) のC末端

側をエンテロペプチダーゼ (entero-peptidase) (Biotechnology, Vol.6, p1204-1210, 1988) で、poly-GlyのC末端側をリソスタフィン (lysostaphin) (特開平1-160496) で、Lys-Arg, Arg-Arg又は Pro-Arg等のC末端側をクリベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) (特開平1-124390) で切断する方法等が挙げられる。

【0023】

例えば、本願発明に係る実施例においては、Kex2プロテアーゼが認識できるアミノ酸配列 (Lys-Arg、Arg-Arg 又はPro-Arg 配列) を切断部位領域に導入し、当該酵素を用いて補助ペプチドから目的ペプチドの切断を行った。

従って、切断処理に使用する酵素の基質特異性に合わせて、切断部位領域のアミノ酸配列中に1つ以上のメチオニン、トリプトファン、プロリン、グリシン、システイン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸又はグルタミン酸を存在させることが好ましい。

【0024】

なお、最終目的ペプチドとするために修飾が必要な場合 (例えば、アミド化ペプチド) は、補助ペプチドが付加した目的ペプチド (この場合、最終目的ペプチドの製造中間体ペプチド) から当該目的ペプチドを切り出す前又は切り出した後に修飾反応 (例えば、アミド化酵素によるアミド化修飾反応) を行うことができる。更に、効率的に修飾反応を行いたい場合、目的ペプチドを切り出す前に補助ペプチドが付加した目的ペプチドに修飾反応 (例えば、アミド化修飾反応) を行い、補助ペプチドが付加した最終目的ペプチドを得、その後、補助ペプチドと最終目的ペプチドとの間にある切断部位領域を切断することにより最終目的ペプチドを得ることができる。

【0025】

上記の方法により、高純度の目的ペプチドを高収率で得ることが可能であるが、補助ペプチドが付加した目的ペプチドを高発現させれば、更に大量の目的ペプチドを得ることができる。そのためには従来の融合蛋白法において行われているような保護ペプチドを更に付加して発現させてもよい。即ち、補助ペプチドが付加した目的ペプチドのN末端又はC末端に更に保護ペプチドを付加した融合蛋白

として宿主細胞内に高発現させてもよい。

【0026】

本発明に係る製造法に用いることができる保護ペプチドは特に限定されるものではなく、従来の方法において用いられたものを適宜修飾して用いることができる。例えば、特開昭54-145289 においては保護ペプチドとして大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに係るアミノ酸配列を有するフラグメントを用いている。当該酵素に係るアミノ酸配列は当業者にとって公知であり、 β -ガラクトシダーゼ由来のペプチドフラグメントは広く当業者により融合蛋白法における保護ペプチドとして用いられている。本願発明に係る製造法においても、補助ペプチドが付加された目的ペプチドの特性を考慮して、常法により β -ガラクトシダーゼに係るアミノ酸配列を適切に修飾したペプチドフラグメントを保護ペプチドとして用いることができる。また、保護ペプチドに係るアミノ酸配列をコードするDNA塩基配列を化学合成することも可能である。

【0027】

保護ペプチドを有する融合蛋白については、切断処理反応後のクロマトグラフィー工程でのフラグメント分離能を高めるために、当該融合蛋白を構成する保護ペプチド若しくは補助ペプチドが付加した目的ペプチド及び当該融合蛋白自体に係る各等電点が異なるように工夫して設定することが望ましい。補助ペプチドと目的ペプチドについても同様である。

【0028】

上記のように保護ペプチドを付加させる場合、補助ペプチドが付加した目的ペプチドと保護ペプチドとの間にも切断部位領域を設定する必要があるが、上述の設定方針に従って適宜好適な切断効率の高い切断部位領域を設定することができる。但し、保護ペプチドを有する融合蛋白から補助ペプチドが付加した目的ペプチドを経て目的ペプチドを得る場合、複数の切断部位領域が設けられるために各部位における多段階の融合蛋白の切断方法が必要になる。この場合、最初に補助ペプチドが付加した目的ペプチドと保護ペプチドとの間の切断部位領域において切断処理を行い、次に補助ペプチドと目的ペプチドとの間の切断部位領域において切断処理を行なうことにより目的ペプチドを得ることができる。

【0029】

上記の製造方法は汎用性があることを確認するために各切断部位領域を化学的又は酵素的に切断する方法について検討を行い、何れの切断処理方法によっても実施可能であることを確認した。このような切断部位領域に係るペプチド鎖の部位特異的切断方法の代表例としては、

(1) 保護ペプチド及び目的ペプチドがシステイン残基をそのアミノ酸配列中に含まないことを利用し、補助ペプチドが付加した目的ペプチドと保護ペプチドの間にシステインを挿入し、シアノ化、アルカリ処理にて当該部位において融合蛋白を特異的に切断する方法、

(2) 各切断部位領域における切断は共に同一酵素で行うが、酵素認識部位に異なったアミノ酸配列を用いることで、一方の切断部位領域での反応条件下では、他方の切断部位領域での切断が起こらない様にする方法、及び

【0030】

(3) 各切断部位領域において共に同一酵素で切断を行うが、補助ペプチドと目的ペプチドの間に存在する切断部位領域（切断部位領域2）のアミノ酸を修飾することにより、補助ペプチドが付加した目的ペプチドと保護ペプチドの間に存在する切断部位領域（切断部位領域1）に係る切断の反応条件下では、切断部位領域2での切断が起こらない様にし、切断部位領域1での切断後、補助ペプチドが付加した目的ペプチドを精製し、修飾されたアミノ酸を再度修飾して切断部位領域2を上記酵素で切断可能にする方法等が挙げられる。

【0031】

なお、本発明において用いることができる宿主細胞は特に限定されるものではなく、従来の方法において既に用いられている原核細胞又は真核細胞、例えば大腸菌等の微生物細胞、酵母又は動物細胞等を、補助ペプチドが付加された目的ペプチドをコードする塩基配列が当該配列を有する発現ベクターにより好適に発現できるものを適宜選択して用いることができる。更に、高発現に必要なその他の要素、例えばプロモーター、ターミネーター、スプライス部位等についても従来の方法において既に知られているものを適宜用いることができる。

本発明に係る目的ペプチドの製法において、目的ペプチドをGLP-1 とした場合

を以下に説明する。

【0032】

GLP-1 発現プラスミド（以下、pGP97ompPR）がコードする融合蛋白（以下、GP97ompPR）は、GLP-1 [G] のN末端側に塩基性ペプチド領域を含む補助ペプチドを付加したペプチド（以下、RHHGP [G]）を有し、更にRHHGP [G] のN末端側に大腸菌 β -ガラクトシダーゼ誘導体（ β -gal97S）を保護ペプチドとして付加した融合蛋白である。当該保護ペプチドとRHHGP [G] との間及びRHHGP [G] に係る補助ペプチドとGLP-1 [G] の間には各々切断部位領域が導入されている。当該各領域は、一方の切断部位領域では大腸菌由来の内在性OmpTプロテアーゼにより切断されるように、また他方の切断部位領域ではKEX2プロテアーゼにより切断されるように基質特異性に係るアミノ酸配列を有している。

【0033】

また、GP97ompPR については、切断処理反応後のクロマトグラフィー工程でのフラグメント分離能を高めるために、GP97ompPR を構成する β -gal97S 若しくはRHHGP [G] 及びGP97ompPR 自体に係る各等電点が異なるように工夫され設定されている。例えば、後述の実施例ではGP97ompPR の等電点は5.95、 β -gal97S の等電点は4.60及びRHHGP [G] の等電点は10.09 となるように設定されている。

次に、pGP97ompPRにより形質転換された大腸菌（W3110/pGP97ompPR）を培養してGP97ompPR の発現を行った。GP97ompPR は菌体内に不溶性蛋白として高発現され、封入体中に蓄積された。最終菌体濃度は約 $OD_{660nm} = 1.80$ であった。

【0034】

菌体破碎後、尿素を用いてGP97ompPR を可溶化した後、封入体中に含まれる内在性OmpTプロテアーゼによりGP97ompPR 中に存在する保護ペプチド β -gal97S と補助ペプチドが付加した目的ペプチドRHHGP [G] の間の切断部位領域を切断した。OmpTプロテアーゼは特異的に当該切断部位領域を切断し、切断効率は85%であった。

次に、 β -gal97S とRHHGP [G] を分離するため、また尿素を除去するために陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。未切断のGP97ompPR（ $pI=5.95$ ）と β -gal97（ $pI=4.60$ ）は等電点が酸性側のためにこのカラムに吸着せず、RHHGP [G]（ $pI=1$

0.09) が吸着された後、溶出される。このわずか 1 工程のカラム処理により純度が 99.1% の RHHGP [G] が得られた。生産工程の最初のカラム工程でこの様な純度が高く、かつ高収率で RHHGP [G] が得られることは、工業的な大量生産上非常に有用である。

【0035】

次に、得られた RHHGP [G] に、アミド化酵素 (B.B.R.C, Vol.150, p1275-1281, 1988, EP299790A) を用いてアミド化修飾反応を行った。後述の実施例で示した反応条件では、酵素基質としての RHHGP [G] 及び反応生成物であるアミド化された補助ペプチドが付加した GLP-1 (以下、RHHGP-1) の凝集やゲル化は起こらず、98% の高い反応率で RHHGP-1 を生成することができた。これらの結果より、RHHGP [G] を基質としてアミド化酵素反応を行う際の補助ペプチドの有用性が実証された。

アミド化修飾反応後、Kex2 プロテアーゼを用いて RHHGP-1 中に存在する補助ペプチドと目的ペプチドの間の切断部位領域を切断した。後述の実施例に係る反応条件では切断効率 95% 以上で反応が進行した。

【0036】

次に、GLP-1 を更に精製するため陽イオン交換クロマトグラフィーを行った後、疎水性クロマトグラフィーを行った。全工程の最終収率は約 50% であり、純度 98% の GLP-1 が 13.5 g 得られた。精製に使用した培養液は 8 リットル相当であり、培養液 1 リットルあたり約 1.68 g 得られたことになる。この収率及び収量は共に非常に高く、補助ペプチドを用いた本発明に係る製法の有用性が実証できた。即ち、本発明に係る製造法は目的ペプチドを十分に工業的スケールで製造することを実施可能ならしめるものである。

【0037】

本発明の意図の一つとして、補助ペプチドと GLP-1 [G] からなるペプチドを経ることにより、上述のようにアミド化酵素のような修飾酵素等の反応時における凝集性の改善や溶解度を上げることが挙げられる。そこで、当該有用性があるか否かについて更に確認してみるために、RHHGP [G]、RHHGP-1、GLP-1 [G] 及び GLP-1 を精製し、各々のペプチドの溶解度の pH 依存性を調べた。その結果、GL

P-1 [G] は予想した通りに pH5.0 から pH7.0 の範囲で溶解度が低いことが明らかになった。一方、RHHGP [G] は pH4.0 から pH6.0 付近まで溶解度が高い結果が得られた。この結果により、アミド化酵素反応は弱酸性領域で行なわれるために、酵素基質としては RHHGP [G] を GLP-1 [G] の代わりに用いる有用性が確認された。

【0038】

各ペプチドの溶解度の pH 依存性を検討した実験において、RHHGP [G] 及び RHHGP-1 は各々 pH6.0, pH6.4 付近で急激に溶解度が低下した。また、GLP-1 は経時的に沈殿あるいは微結晶を形成した。従って、RHHGP [G] 及び RHHGP-1 の中性から弱アルカリ領域での溶解度を上げる物質、及び弱酸性から弱アルカリ領域で GLP-1 の溶解性を維持できる物質があれば、生産工程上非常に有用であると考えられる。

【0039】

そこで、そのような物質を鋭意検討した結果、反応液に RHHGP [G] 及び RHHGP-1 の場合は界面活性剤の添加（例えば、0.1% 添加）、GLP-1 の場合は界面活性剤の添加（例えば、0.3% 以上の添加）及び／又は塩の添加（100mM 以上の添加）により有効に凝集を防ぐことができることを見出し、本発明に係る製法工程に導入してその有用性もあわせて実証することができた。

本発明に係る製造法を用いた GLP-1 の製造工程について、GLP-1 の 10 グラムスケールの精製を行った各工程収率のまとめを表 1 に示した（GLP-1 生産菌 W3110/pGP97ompPR を 20 リットル培養し、その培養液 8 リットル相当分を精製に使用した）。

【0040】

【表 1】

表 1 GLP-1 生産工程のまとめ

工程	GLP-1量(g)	単位工程収率(%)	回収率(%)
培養 (8L培養液相当)	26.87	100	100
OmpT反応	22.95	85.4	85.4
SPセファロースクロマト	20.22	98.8	76.2
アミド化酵素反応	20.70	100	77.0
Kex2酵素反応	18.70	90.4	69.6
Macrorep HS クロマト	16.78	93.7	62.4
Poros R2クロマト	13.48	80.4	50.2

GLP-1量はHPLCのピーク面積とアミノ酸の数比からの換算値から求めた。

【0041】

表 1 から明らかなように各工程の単位工程収率は非常に高く、また最終の回収率が約 50%と非常に高いことが示された。従って、本発明に係るペプチドの製造法がGLP-1 の製造において適用可能であり、且つ工業生産レベルでのスケールアップが可能であることは明らかである。更に、OmpTプロテアーゼ及びKex2プロテアーゼによる切断処理反応の工程において単位工程収率が各々 85%及び 90.4%であることから、設定した各切断部位領域には酵素による切断処理反応に非常に適したアミノ酸配列が用いられていることも確認された。

以上のように、本発明では、GLP-1 の製法を例として、目的のペプチドが本来有する物理化学的性質のため製造工程上問題となる点を補助ペプチドを用いることで改善できることを実証した。

【0042】

既に述べたように、補助ペプチドを用いた本発明に係るペプチドの製法により高純度の目的ペプチドを高収率で得ることが可能であるが、補助ペプチドと目的

ペプチドからなるペプチドを高発現させて大量の目的ペプチドを得るために更に保護ペプチドを付加した融合蛋白として発現させる方法も用いることができる。上記のGLP-1の製造も保護ペプチドを付加した融合蛋白を用いた製法により行うことができるが、当該融合蛋白から補助ペプチドが付加した目的ペプチドを経て目的ペプチドを得る場合、複数の切断部位領域が設けられるために各領域における多段階の融合蛋白の切断方法が必要になる。

【0043】

そこで、各切断部位領域を化学的又は酵素的に切断する方法について検討を行い、特に、後述の実施例において確認された大腸菌OmpTプロテアーゼで切断する方法以外によっても可能であることを確認した。このような、切断部位領域に係るペプチド鎖の部位特異的切断方法の代表例としては、

(1) 保護ペプチド及び目的ペプチドがシステイン残基をそのアミノ酸配列中に含まないことを利用し、保護ペプチドのC末端にシステインを挿入し、シアノ化、アルカリ処理にて該システインN末端側で融合蛋白を特異的に切断する方法、

(2) 各切断部位領域における切断は共にKex2プロテアーゼで行うが、酵素認識部位に異なったアミノ酸配列を用いることで、一方の切断部位領域での反応条件下では他方の切断部位領域での切断が起こらない様にする方法、及び

【0044】

(3) 各切断部位領域において共にKex2プロテアーゼで切断を行うが、一方の切断部位領域(切断部位領域2)のアミノ酸を修飾することにより、他方の切断部位領域(切断部位領域1)に係る切断の反応条件下では、前者の切断部位領域(切断部位領域2)での切断が起こらない様にし、後者の切断部位領域(切断部位領域1)での切断後、補助ペプチドと目的ペプチドからなるペプチドを精製し、修飾されたアミノ酸を再度修飾して前者の切断部位領域(切断部位領域2)をKex2プロテアーゼで切断可能にする方法等が挙げられる。

【0045】

【実施例】

本発明を具体的実施例により更に詳細に説明する。

実施例 1 プラスミドの構築

GLP-1 を生産するためにデザインされた融合蛋白質(GP97ompPR) をコードする pGP97ompPR発現プラスミドは、以下に示す 4 段階のステップを経て作製した。なお、制限酵素処理、ライゲーション反応、5' 末端のリン酸化、PCR の条件は常法に従った。

【0046】

(1) ステップ 1 pG117S4HR6GLP-1の作製

大腸菌OmpTプロテアーゼにより切断されるGP97ompPR を設計する目的で、OmpTプロテアーゼの認識配列であるArg-Arg 配列を有するアミノ酸配列 R 6 (図 2 参照) をコードする R 6 合成DNA (図 6 参照) を pG117S4HGP (特開平9-296000参照) のStuI部位に挿入し、pG117S4HR6GLP-1 を作製した(図 2)。

【0047】

(2) ステップ 2 pG117S4HompRHKR の作製

大腸菌OmpTプロテアーゼによる切断の効率をさらに高めるため、R6部分の配列を変化させた。pG117S4HR6GLP-1 をNsi I 及びHind IIIで切断して得られる3.2kb の断片(断片A)、pG117S4HR6GLP-1 をBamH I及びHind IIIで切断して得られる0.2kb の断片(断片B)、及びOmpTプロテアーゼの認識配列であるArg-Arg 配列を有するアミノ酸配列 L 1 (図 3 参照) をコードする L 1 合成DNA (図 6 参照) を連結させ、pG117S4HompRHKR を作製した(図 3)。

【0048】

(3) ステップ 3 pG117S4HompRHPR の作製

切断部位領域における大腸菌OmpTプロテアーゼ認識配列とKex2プロテアーゼ認識配列とを異なった配列とするため、Kex2プロテアーゼ認識配列をLys-Arg からPro-Arg に置換することを行った。P1及びP2プライマー(図 6 参照)を合成し、pG117S4HompRHKR を鋳型としてPCR を行い、0.1kb のDNA 断片を調製した。得られたDNA 断片をBgl II及びSph I で処理した後、pG117S4HompRHKRをBgl II及びSph I で切断して得られる3.2kb の断片(断片C)とpG117S4HompRHKR をSph I 及びHind IIIで切断して得られる0.2kb の断片(断片D)に連結し、pG117S4HompRHPR を作製した(図 4)。

【0049】

(4) ステップ4 pGP97ompPRの作製 (図5)

保護ペプチド部分をさらに縮小する目的で、pGP97ompPR を作製した。P3及びP4プライマー (図6参照) を合成し、pG117S4HompRHPR を鋳型としてPCR を行い、DNA 断片を調製した。得られたDNA 断片をPvu II及びNsi I で処理した後、pG117S4HompRHKR をPvu II及びNsi I で切断して得られる3.2kb の断片に連結し、pGP97ompPRを作製した。

作製されたプラスミドpGP97ompPRがコードする融合蛋白 (GP97ompPR) のアミノ酸配列を図7に、当該アミノ酸配列をコードするDNA 塩基配列を図8に示す。

【0050】

実施例2 融合蛋白 (GP97ompPR) の発現

pGP97ompPR を有する大腸菌W3110 株を30リットル・ジャーファーマンターを用いて、4 g/l K_2HPO_4 , 4 g/l KH_2PO_4 , 2.7 g/l Na_2HPO_4 , 0.2 g/l NH_4Cl , 1.2 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 4 g/l 酵母エキス, 2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 40 mg/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/l $MnSO_4 \cdot nH_2O$, 10 mg/l $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 4 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg/l $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 mg/l H_3BO_4 , 3g /l L-メチオニン、10mg/l テトラサイクリンを含む培地 (20L、pH7.0) で、培養温度を12時間までは32℃、その後は37℃とし、グルコースを添加しながら、24時間にわたり培養を行った。培地pHは28%アンモニア液を添加し、pH7.0に制御した。

【0051】

図8は菌体濃度 (OD660) の推移と各サンプリング時点における融合蛋白質 (GP97ompPR) の発現を、16% SDS-PAGEにより調べた結果である。GP97ompPR は封入体として発現し、培養終了時には全菌体蛋白質の30% 以上を占めた。

培養後、マントンゴリーンホモジナイザー (15M-8TA) を用いて、培養液を500K g/cm^2 の条件でホモジナイズ処理し、遠心機により沈殿画分 (封入体) を回収した。次に得られた沈殿を洗浄するため、培養液と等量の脱イオン水を添加し、懸濁後、再度遠心分離を行い、沈殿を回収した。この洗浄操作をさらにもう一度繰り返し、最終的に得られた沈殿を適量の脱イオン水に懸濁した。

【0052】

実施例 3 GP97ompPR の大腸菌OmpTプロテアーゼによるプロセッシング

得られた封入体懸濁液をOD660 の値が1000となるように希釈した後、その1000 ml を採取し、pH未調整の1M Tris-HCl を250 ml、0.5M EDTA(pH8.0)を10 ml、粉末尿素1200g を添加し、その後、脱イオン水を加え最終容量を5000mlとした。次に、塩酸を用いてpHを7.5 に調整し、37℃で2 時間加温した。この操作により封入体中に存在している大腸菌OmpTプロテアーゼが働き、GP97ompPR を切断し、RHHGP [G] が遊離された。

【0053】

図10はGP97ompPR からのRHHGP [G] の切り出しを、逆相HPLCにより分析した結果である。分析はYMC PROTEIN-PRカラムを用い、溶液A に0.1%トリフルオロ酢酸を含む10% アセトニトリル溶液、溶液B には0.095%トリフルオロ酢酸を含む70 % アセトニトリル溶液を用い、1ml/min の流速にて、溶液B を13分間で44 % から70 %とする直線濃度勾配で行った。本操作により85% のGP97ompPR が切断を受け、反応終了後の試料には、RHHGP [G] に相当するピークが得られた (図20A)。

【0054】

なお、大腸菌OmpTプロテアーゼを用いた切断処理による融合蛋白からの補助ペプチドが付加したGLP-1 [G] の切出しはpGP97ompPR由来の融合蛋白に限ったものではなく、実施例1で作製されたpG117S4HR6GLP-1、pG117S4HompRHKR及び pG117S4HompRHPR由来の融合蛋白質においても同様に可能であった。これらのプラスミド由来の融合蛋白のアミノ酸配列を図11、図12及び図13に示す。

【0055】

実施例 4 RHHGP [G] の精製

大腸菌OmpTプロテアーゼ反応後、尿素、Tween 80をそれぞれ、7M、0.1%となるように添加した後、NaOHにてpHを8.0 とした。その後、遠心分離して上清を得た。SP-Sepharose BigBeads (ファルマシア・バイオテクノロジー社)を充填したカラムを100 mM Tris HCl (pH8.0)、次いで20 mM Tris HCl (pH8.0) / 5 M尿素 / 0.1% Tween 80にて平衡化した。上記の上清を平衡化したカラムに添加し、同

平衡化液にて洗浄、次いで、0.2 M NaCl / 20 mM Tris HCl (pH8.0) / 0.1% Tween 80 にて洗浄し、0.5 M NaCl / 20 mM Tris HCl (pH8.0) / 0.1% Tween 80 にて溶出した (図 14)。本溶出液中の RHHGP [G] の純度は 99% と高く、一段のクロマトグラフィーで以降の酵素反応に適した試料が得られた (図 20B)。

【0056】

実施例 5 補助ペプチド-GLP-1 [G] のアミド化

C末端アミド化酵素を用いて実施例 4 で得られた RHHGP [G] を RHHGP-1 に変換した。RHHGP [G] を基質とした場合の反応条件を決定するため、0.5 ml の反応容積で pH、温度、硫酸銅濃度、カタラーゼ濃度、基質濃度、L-アスコルビン酸濃度、及びアミド化酵素濃度の至適化を行った。また、RHHGP [G] と RHHGP-1 の分離分析は、イオン交換 HPLC カラム (Poros S/H、パーセプティブバイオシステム社) を用い、30 mM Britton - Robinson 緩衝液 (以下、BR 緩衝液) 存在下、pH 勾配溶出 (6.0 - 9.0) で行った。

【0057】

本反応条件の至適 pH は 5.0 ~ 5.5 であった (図 15)。至適反応条件は 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)、5.0 μ M 硫酸銅、0.5 g/l L-アスコルビン酸、1 μ g / ml カタラーゼ、5.0 mg / ml RHHGP [G]、温度 32℃、1500 unit / ml

アミド化酵素であった。本条件に後述の実施例 10 において判明した凝集抑制効果を有する Tween 80 (0.1%) を加え、RHHGP [G] 溶液 5 リットルを上記の条件で反応を行い、EDTA を添加することで反応を停止した。本条件下による反応の結果、RHHGP [G] は 1 時間で 98% 以上の反応率で RHHGP-1 に変換された (図 16)。

【0058】

実施例 6 RHHGP-1 から Kex2 プロテアーゼによる GLP-1 の切り出し

Kex2 プロテアーゼによるプロセッシング反応は、基質となる部分の配列によって pH 依存性及び活性変化を示す (EP794255A)。そこで、0.5 ml 反応容量で pH、塩化カルシウム濃度及び添加酵素量の至適化を行った。RHHGP-1 の場合は、pH8.0 で最大となることが示された (図 17)。RHHGP-1 を基質にした場合の至適反応条件は、10 mM Tris · HCl (pH8.0)、1 mM 塩化カルシウム、8,000 ユニット / ml Kex2 プロテアーゼ及び反応温度 30 - 32℃ とした。後述の実施例 10 の結

果から、反応溶液中のNaCl濃度を0.1 M 以上とし、更にTween 80を0.1 % 反応溶液中の添加することで凝集を抑制する事ができた。

実施例 5 のアミド化反応後の試料溶液本条件で 30 度で 2 時間反応させることで、95 % 以上の反応率を得た (図 20 C)。本反応中、GLP-1 の沈殿形成はみられなかった。

【0059】

実施例 7 陽イオン交換クロマトグラフィー

微量混在する不純物を除去するため、陽イオン交換樹脂 (Macroprep High-S、バイオラッド社) を用い、pH 勾配溶出にて GLP-1 と分離した。カラムを、20 mM BR 緩衝液 (pH 4.5) / 20 mM NaCl / 0.3 % Tween 80 にて平衡化した。試料溶液の組成を 0.3 M NaCl / 0.3 % Tween 80、pH 4.5 とした。当該試料溶液をカラムに添加し、平衡化液にて洗浄した。平衡化液 (A 液) と、溶出液 (B 液; 平衡化液と同じ組成で pH 7.0) を用いて 50 % B 液から 100 % B 液へのリニアグラジエントにて、GLP-1 の溶出を行い (図 18)、不純物の割合を 0.5 % 未満とした (図 19)。本工程で、実施例 6 までに添加された各試薬、未反応物及び微量不純物の大半は除去され、純度 98 % 以上の GLP-1 が得られた (図 20 D)。プールされた溶液は pH 4.5、4℃ にて保存した。

【0060】

実施例 8 GLP-1 最終精製

前述の実施例 7 で純度 98 % 以上の GLP-1 が得られた。しかし、医薬品として使用する場合には目的ペプチドの純度もさることながら、非ペプチド性のエンドトキシンの混入を避けなければならない。そこでペプチド性医薬品最終精製に頻繁に使用される分取逆相 HPLC カラムを使用し、エンドトキシンなどの除去を試みたが、カラム内で GLP-1 の凝集及び／又はゲル化が起こる場合があった。GLP-1 の易凝集性は、スケールアップに際し、大きな危険因子となることが予測された。

【0061】

一方、疎水性クロマト樹脂は、逆相クロマト樹脂と同様に、物質の疎水性を利用して吸着させるものであるが、その官能基の密度は一般に低く、吸着容量は 5

-15 mg/ml 樹脂である。しかし、担体の種類、官能基の種類は豊富で、GLP-1 の様な易凝集性を有するペプチドでも、高回収率を与えるものを選べる可能性がある。そこで種々の疎水性クロマト樹脂を検討した結果、ブチル基、イソブチル基、ヘキシル基あるいはフェニル基を持つ親水性の担体からなる樹脂、あるいは、Poros R2 に代表されるポリスチレン系の樹脂が適していることが判明した。以下、そのような樹脂の一つとして、Poros R2 (パーセプティブバイオシステム社) の例を示す。

【0062】

本樹脂の GLP-1 に対する最大吸着容量は約 12 mg/ml 樹脂と、他の疎水性クロマト用樹脂にくらべて高く、溶出時の GLP-1 濃度が高くなり、凍結乾燥に適していることが示唆された。

800 ml のカラムを、10 mM 酢酸アンモニウム (pH4.5) にて平衡化し、実施例 7 における試料溶液を添加し、平衡化液で洗浄後、さらに 0.2% 酢酸で洗浄し、0.2% 酢酸/40% アセトニトリルで溶出した。GLP-1 の回収率は 80% で、純度は 98% であった (図 20 E)。

【0063】

本標品は、揮発性の酸を低濃度含むのみであり、有機溶媒除去の後、容易に凍結乾燥が行えた。凍結乾燥品を再溶解し、ゲル化法 (リムルス ES-II テスト、和光純薬社) にてエンドトキシンを測定した結果、検出限界以下 (0.03 u/mg 以下) であった。上記実施例 8 で示したカラム操作で高収率かつ高純度の GLP-1 が精製でき、さらに凍結乾燥できる溶媒で溶出できることは産業上非常に有用であることは言うまでもない。

【0064】

実施例 9 補助ペプチドを用いることによる凝集性の緩和

補助ペプチドを利用する本発明に係る製造法においては、従来の製法では問題となっていた目的ペプチドの物理化学的性質に由来する特性である凝集性の改善を一つの目的としているので、当該改善の有無を実証する必要がある。そこで本実施例においては、補助ペプチドと GLP-1 [G] からなるペプチド及び補助ペプチドとアミド化された GLP-1 からなるペプチドの凝集性が GLP-1 [G] 及び GLP-1 に比較

して改善されているかを検討した。

【0065】

まず、RHHGP [G] を精製し、その凝集性がGLP-1 [G] に比べて改善されているかを調べた。各ペプチドの試料は、RHHGP [G] についてはSP-Sepharose BigBeads クロマトグラフィーにて精製した試料を、RHHGP-1 については精製したRHHGP [G] をアミド化した試料を、GLP-1 [G] については精製したRHHGP [G] をKex2プロテアーゼにより切断した試料を、GLP-1 についてはRHHGP-1 をKex2プロテアーゼにより切断した試料を、各々Poros R2カラムを用いてアセトニトリル濃度勾配溶出することで純度98%にまで精製し、凍結乾燥して調製した。

【0066】

凝集性は各ペプチドの溶解性に密接に関係していると考えられるので、各ペプチドの溶解度のpH依存性を検討した。その結果を図21及び図22に示す。GLP-1 [G] はpH5.5 からpH 6.5で溶解度が低く、アミド化酵素反応条件至適pHである弱酸性から中性pH条件下では溶解性が低く、製造中間体として不適切であることが判る。

一方、RHHGP [G] 及びRHHGP-1 は、pH 6.2付近から溶解度が低下するものの、少なくともpH5からpH6 までは十分な溶解性が保持できるため、アミド化酵素反応条件でも十分効率よく反応が行えることが確認できた。

【0067】

実施例10 凝集抑制をもつ物質のスクリーニング

補助ペプチドを利用する本発明に係る製造法を用いたGLP-1 の工業的レベルでの製造方法の確立において、中性から弱アルカリ性の領域でRHHGP [G] 及びRHHGP-1 の溶解度を上げる物質、及び弱酸性から弱アルカリ性の領域でGLP-1 の溶解性を維持できる物質の検索が必要である（GLP-1 は図21に示した試験においてGLP-1 [G] ほどではないものの、pH5.3 からpH8.0 の広い範囲で経時的に沈殿あるいは微結晶を形成することが明らかになった）。

【0068】

上記の各ペプチドの溶解性を維持できるように溶液に添加する物質として、界面活性剤、糖類、塩、有機溶媒等が候補として考えられる。そこで、界面活性剤

としてはTween 80、Triton X-100、糖類としてはグルコース、マンニトール、シ
ュークロース、塩としてはNaCl、有機溶媒としてはエタノール、グリセロール、
DMSOについてその凝集抑制能の検討を行った。

【0069】

RHHGP [G]、RHHGP-1及びGLP-1の10 mg / ml水溶液を調製し、予め0.1 ml
の300 mM BR 緩衝液(pH7.9)、及び0.1 mlの10倍濃度の被検物質溶液が入った
プラスチックチューブに、各ペプチド溶液0.8 mlを加え、pHをRHHGP [G]はpH7.5
- 8.5、RHHGP-1はpH8.0、GLP-1はpH 6.5と凝集の起こりやすいpHに調製し
、濁度(660 nmの吸光度)を経時的に測定した。得られた結果の内、Tween
80、NaCl及び温度による凝集能抑制効果を図22及び図23に示した。

【0070】

RHHGP [G]、RHHGP-1は0.1 % Tween 80にて沈殿形成が強く抑制されたが(図2
2 A)、GLP-1では0.3 %以上のTween 80(図22 B)、100 mM以上のNaCl(図
23 C)及び／又は低温(図23 D)で凝集が抑制されることが判明した。

上記の結果により、実際の生産系でのpH条件に関して、本発明に係るペプチド
の製造法を用いる場合、塩及び界面活性剤の添加が目的ペプチドの凝集抑制に有
用であることが実証され、高純度かつ高収量で目的のペプチドを生産することが
できることが示された。

【0071】

実施例 11 切断部位領域における切断方法

切断部位領域において切断処理をする際に用いられる切断方法について検討し
た。即ち、(1)切断部位領域1：シアノ化／アルカリ化、切断部位領域2：Kex
2プロテアーゼ、(2)切断部位領域1：Kex2プロテアーゼ、切断部位領域2：
Kex2プロテアーゼ、及び(3)切断部位領域1：DTNB (5, 5'-ditiobis-(2-
nitrobenzoic acid))付加／Kex2プロテアーゼ、切断部位領域2：還元／Kex2プ
ロテアーゼである場合の各切断方法について、目的ペプチドをGLP-1として検討
したところ、本発明に係る製法において保護ペプチドを有する融合蛋白を用いる場
合に、多段階切断反応による切断が化学的又は酵素的処理により実施可能である
ことが明らかとなった。

【0072】

各方法に係る結果を以下に示す。切断反応後に生成する補助ペプチド-GLP-1 [G] からなるペプチドの親水性を増加させ、中性付近での溶解性を改善するために、全ての補助ペプチド中に4連続するヒスチジン配列を導入した。

【0073】

A. (1) の方法を用いたシステイン残基での特異的切断を経由するGLP-1 製造方法

本方法は、目的ペプチドがシステインを含まない場合、一方の切断部位領域中（切断部位領域1）のシステイン残基を化学的に切断する方法であり、例えば、発現した融合蛋白を得た後にCADP (1-cyano-4-(dimethylamino)pyridinium tetrafluoroborate) でシステイン残基をシアノ化した後、アルカリ (NaOH) 処理することより切断部位領域のシステインのN-末端側で特異的に切断できることを確認した。

【0074】

即ち、まず補助ペプチドとしてGCHHHH（配列番号：5）のアミノ酸配列に隣接した切断部位領域1のアミノ酸配列としてPGGRPSRHKR（配列番号：6）を選択し、融合蛋白中に導入した。当該融合蛋白を30mg/mlの濃度で、50mM Tris・HCl (pH8.2)、Tris・HCl (pH8.2)、5M 尿素、10mM DTT（ジチオスレイトール）に溶解し、30℃の恒温槽中で30分保温してシステインを完全に還元した。これを10mM Tris・HCl (pH8.2)、5M 尿素 で平衡化したゲルろ過カラム（ファルマシア社製 PD10カラム）にてDTTを除去した。

【0075】

システインをシアノ化するため、酢酸を最終0.1Mとなるように加え、さらにCADP (1-cyano-4-(dimethylamino)pyridinium tetrafluoroborate) をシステインの4倍モル量加え、30℃で1時間反応させた。残存SH基を、DTNB (5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) で定量することで、シアノ化反応を検証した。

10mM酢酸、5M尿素で平衡化したPD10カラムで過剰の試薬を除去し、

NaOHを最終50mMになるように添加し室温で30分放置してシアノ化されたシステイン部位で上記融合蛋白を特異的に切断した。切断率は約50-70%であった。

他方の切断部位領域（切断部位領域2）については実施例6と同様の方法で切断処理を行った。

【0076】

B. (2)の方法を用いたKex2プロテアーゼによる切断部位領域の切断

各切断部位領域はKex2プロテアーゼ切断部位領域を有しているが、一方の切断部位領域（切断部位領域2）のアミノ酸配列は他方の切断部位領域（切断部位領域1）での切断に係る反応条件では殆ど切断されないように設計された。

Kex2プロテアーゼの切断部位領域に係る切断認識配列の最適化において、P1、P2サブサイトの他に、P4サブサイトのアミノ酸残基に電荷が本酵素の活性に大きく影響すること、特にP4サブサイトに酸性アミノ酸が存在すると、一定の条件下では融合蛋白が全く切断されないことが知られている（特開平9-296000）。

【0077】

これを利用し、例えば、補助ペプチドとしてのHRHKRSHHHH（配列番号：7）からなるアミノ酸配列に隣接した切断部位領域2のアミノ配列をSDHKR（配列番号：8）としてP4サブサイトにアスパラギン酸（D）を導入したところ、融合蛋白中の切断部位領域1に係るKex2プロテアーゼによる切断では90%以上が切断されたが、切断部位領域2は切断から保護された。この結果より、P4サブサイトにアスパラギン酸を導入することで、切断部位領域1が特異的に切断されることが明らかになった。

【0078】

得られた補助ペプチドが付加したGLP-1[G]を分離するため、イオン交換とゲルろ過機能を有するカラムクロマトグラフィー（例えば、セルロファインC-200カラムクロマトグラフィー）を行ったところ、目的の補助ペプチドが付加したGLP-1[G]が特異的に吸着された。一部未反応の融合蛋白も吸着するが、塩濃度勾配で容易に分離できた。回収率は94%であった。なお、このクロマトグラフィ

ーは他の補助ペプチドが付加したGLP-1 にも適用できる。

【0079】

次に、アミド化修飾反応を行った後に、補助ペプチドが付加したGLP-1 からGLP-1 を切りだすために切断部位領域2においてKexプロテアーゼによる切断処理を行った。尿素（変性剤）が存在し且つアルカリ性という第一切断条件下では、Kex2プロテアーゼは切断部位領域2を切断しなかったが、尿素がない状態では、適当なpHを選ぶことで、切断部位領域2を認識できることが判明した。最適pHは6.5～7.3で、切断部位領域1における切断反応条件のpH8.2では切断されにくかったことが示された。

【0080】

これは、上記補助ペプチドが付加したGLP-1 が、それに保護ペプチドが更に付加した融合蛋白とは異なり、尿素非存在下でも、広いpH領域で可溶性であるためである。そこでKex2プロテアーゼを反応させ、逆相HPLCにてペプチドを分離定量し98%以上の切断で終了とした。本系は反応液中に尿素を含んでいないため、Kex2プロテアーゼの失活はほとんど起こらない。そのため必要なKex2プロテアーゼ量は基質とのモル比で1:20000～1:40000と極端に少なくてすむ利点がある。

上記のように、各切断部位領域に係る切断処理において同一の酵素を使用することでGLP-1 が生産できることを実証することができた。

【0081】

C. (3)の方法を用いたシステインの特異的修飾を利用する切断方法

本方法は上記B. (2)の方法とほぼ同様の方法であるが、目的ペプチドにシステイン残基が存在しない場合、一方の切断部位領域（切断部位領域2）にあるシステイン残基を修飾、即ちシステインの側鎖をDTNB (dithionitriobenzoic acid) で処理を行うことで他方の切断部位領域（切断部位領域1）に係るKex2プロテアーゼ切断反応時の切断から保護し、補助ペプチドが付加したGLP-1 [G] からなるペプチドを得た後に還元を行い、切断部位領域2をKex2プロテアーゼで切断する方法である。

【0082】

このような修飾反応にはスルホン酸化、DTNBによる非対称ジスルフィド化が代表例として挙げられるが、システイン側鎖に負電荷を与える方法であればよく、特に限定されるものではない。例えば、補助ペプチドとしてのHRHKRS HHHH（配列番号：7）からなるアミノ酸配列に隣接した切断部位領域2のアミノ配列をSCHKR（配列番号：24）として融合蛋白に導入する。

【0083】

上記のようにデザインされた融合蛋白を発現させ、得られた融合蛋白にDTNB処理を行い、システインを非対象ジスルフィドとした。完全にシステインが修飾されていることを確認後、Kex2プロテアーゼによる切断処理反応を行い、定量的に補助ペプチド-GLP-1 [G] からなるペプチドが得られることを確認した。即ち、切断部位領域2においてKex2プロテアーゼのアミノ酸配列認識部位のP4サイトをシステインとし、その側鎖特異的に負の電荷を導入することで、切断部位領域1に係るKex2プロテアーゼによる切断時に切断部位領域2は切断から保護された。

【0084】

次に、上記Bと同様に精製及びアミド化修飾を行い、DTTを加えて補助ペプチドが付加したGLP-1を還元し、疎水性カラムクロマトグラフィーにより純度98%まで精製し凍結乾燥を行った。本品を5 mg/mlの濃度で20 mM BisTris (pH7.0), 2 mM 塩化カルシウムに溶解し、1000ユニット/mlのKex2プロテアーゼを加え、30℃で反応させたところ、補助ペプチドが付加したGLP-1は特異的に切断されてGLP-1が生成した。

本実施例では切断部位領域2を還元状態で行ったが、正電荷を持たせるような修飾を行って、Kex2プロテアーゼに対する反応性を変化させることも可能であることは言うまでもない。

【0085】

【発明の効果】

本発明者は生理活性ペプチドを工業的スケールで効率的にかつ安価に製造する方法を提供した。本発明の実施例で示したように、今まで、工業的スケールでの生産が困難であったGLP-1を高純度、かつ高収量で生産することが可能であるこ

とをここに示した。本発明者の開示した方法はGLP-1 以外の生理活性ペプチドの生産に可能であり、産業上の有用性は極めて高いと言える。

【0086】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Asp Asp Lys

1

【0087】

配列番号：2

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ile Glu Gly Arg

1

【0088】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Phe His Leu Leu Val Tyr

1

5

【0089】

配列番号：4

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

【0090】

配列番号：5

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Cys His His His His

1 5

【0091】

配列番号：6

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Gly Gly Arg Pro Ser Arg His Lys Arg

1 5 10

【0092】

配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

His Arg His Lys Arg Ser His His His His

1 5 10

【0093】

配列番号：8

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Asp His Lys Arg

1 5

【0094】

配列番号：9

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His

1 5 10 15

Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser

20

【0095】

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser

20

【0096】

配列番号：11

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CAG ATG CAT GGT TAT GAC GCG GAG CTC CGG CTG TAT CGC CGT CAT CAC 48

Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His

1 5 10 15

CGG TGG GGT CGT TCC GGA TCC 69

Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser

20

【0097】

配列番号：12

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His

1 5 10 15

Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser

20

【0098】

配列番号：13

配列の長さ：44

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TGTTATGAC GCGGAGCTCC GCCTGTATCG CCGTCATCAC GGTT

44

【0099】

配列番号：14

配列の長さ：52

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CCGGAACCGT GATGACGGCG ATACAGGCGG AGCTCCGCGT CATAACCATG CA

52

【0100】

配列番号：15

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GA CTCAGATC TTCCTGAGGC CGAT

24

【0101】

配列番号：16

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AAAGGTACCT TCCGCATGCC GCGGATGTCG AGAAGG

36

【0102】

配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG

20

【0103】

配列番号：18

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AAAATGCATC GCATCGTAAC CGTGCATCT

29

【0104】

配列番号：19

配列の長さ：627

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CCCAGGCTTT	ACACTTTATG	CTTCCGGCTC	GTATGTTGTG	TGGAATTGTG	AGCGGATAAC	60
AATTTACAC	AGGAAACAGC	T ATG ACC	ATG ATT	ACG GAT	TCA CTG	111
		Met Thr	Met Ile	Thr Asp	Ser Leu	
		1		5	10	
GTT TTA	CAA CGT	AAA GAC	TGG GAT	AAC CCT	GGC GTT	159
Val Leu	Gln Arg	Lys Asp	Trp Asp	Asn Pro	Gly Val	
		15		20	25	
CGC CTT	GCA GCA	CAT CCC	CCT TTC	GCC AGC	TGG CGT	207
Arg Leu	Ala Ala	His Pro	Pro Phe	Ala Ser	Trp Arg	
		30		35	40	
GCC CGC	ACC GAT	CGC CCT	TCC CAA	CAG TTG	CGC AGC	255
Ala Arg	Thr Asp	Arg Pro	Ser Gln	Gln Leu	Arg Ser	
		45		50	55	
TGG CGC	TTT GCC	TGG TTT	CCG GCA	CCA GAA	GCG GTG	303
Trp Arg	Phe Ala	Trp Phe	Pro Ala	Pro Glu	Ala Val	
		60		65	70	
CTG GAG	TCA GAT	CTT CCT	GAG GCC	GAT ACT	GTC GTC	351
Leu Glu	Ser Asp	Leu Pro	Glu Ala	Asp Thr	Val Val	
		75		80	85	
					90	
TGG CAG	ATG CAC	GGT TAC	GAT GCG	ATG CAT	GGT TAT	399
Trp Gln	Met His	Gly Tyr	Asp Ala	Met His	Gly Tyr	
		95		100	105	
CGC CTG	TAT CGC	CGT CAT	CAC GGT	TCC GGA	TCC CCT	447
Arg Leu	Tyr Arg	Arg Arg	His His	Gly Ser	Gly Ser	
		110		115	120	
CGG CAT	GCG GAA	GGT ACC	TTT ACC	AGC GAT	GTG AGC	495
Arg His	Ala Glu	Gly Thr	Phe Thr	Ser Asp	Val Ser	
					Ser Tyr	
					Leu Glu	

125	130	135	
GGT CAG GCG GCA AAA GAA TTC ATC GCG TGG CTG GTG AAA GGC CGT GGT			543
Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly			
140	145	150	
TAAGTCGACA GCCCGCCTAA TGAGCGGGCT TTTTTTCTC GGAATTAATT CTCATGTTTG			603
ACAGCTTATC ATCGATAAGC TTTA			627

【0105】

配列番号：20

配列の長さ：154

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp	
1 5 10 15	
Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro	
20 25 30	
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro	
35 40 45	
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe	
50 55 60	
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro	
65 70 75 80	
Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr	
85 90 95	
Asp Ala Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His	
100 105 110	
His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr	
115 120 125	

Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu

130

135

140

Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

145

150

【0106】

配列番号：21

配列の長さ：187

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp

1

5

10

15

Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro

20

25

30

Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro

35

40

45

Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe

50

55

60

Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro

65

70

75

80

Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr

85

90

95

Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro

100

105

110

Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His His Gly Gly Arg Gln

115

120

125

Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg

130

135

140

Trp Gly Arg Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Lys Arg His Ala Glu Gly
 145 150 155 160
 Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys
 165 170 175
 Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 180 185

【0107】

配列番号：22

配列の長さ：184

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110
 Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His His Gly Gly Arg Gln
 115 120 125

Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly
 130 135 140
 Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Lys Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
 165 170 175
 Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 180

【0108】

配列番号：23

配列の長さ：184

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110

Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His His Gly Gly Arg Gln

115

120

125

Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly

130

135

140

Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr

145

150

155

160

Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile

165

170

175

Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

180

【0109】

配列番号：24

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Cys His Lys Arg

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、補助ペプチドを利用した目的ペプチドの製造方法の概略を示す。

【図2】

図2は、pG117S4HR6GLP-1 の作製方法を示す図である。

【図3】

図3は、pG117S4HomprHKKR の作製方法を示す図である。

【図4】

図 4 は、pG117S4HompRHPR の作製方法を示す図である。

【図 5】

図 5 は、pGP97ompPR の作製方法を示す図である。

【図 6】

図 6 は、pGP97ompPR の作製に用いたオリゴヌクレオチド及びプライマーを示す図である。

【図 7】

図 7 は、pGP97ompPR にコードされた融合蛋白 (GP97ompPR) のアミノ酸配列を示す図である。下線部は GLP-1 [G] の由来のアミノ酸配列を示し、二重下線部は補助ペプチドの配列を示す。↓ は大腸菌 OmpT プロテアーゼによる切断部位を示し、二重下線の後の矢印は kex2 エンドプロテアーゼによる切断部位を示す。

【図 8】

図 8 は、pGP97ompPR にコードされた融合蛋白 (GP97ompPR) の DNA 塩基配列を示す図であり、塩基番号 1 の A から 462 の T まだが GLP-1 [G] に係る融合蛋白をコードする領域である。lac P0 は大腸菌 ラクトース オペロンのプロモーター/ オペレーター領域を示す。

【図 9】

図 9 は、生産菌の培養と融合蛋白 (GP97ompPR) の発現を示す電気泳動図の図面代用写真であり、図中にサンプリング時 a から e の試料の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す。図中の矢印は融合蛋白質のバンドを示す。

【図 10】

図 10 は、封入体に内在する大腸菌 OmpT プロテアーゼを用いた融合蛋白 (GP97ompPR) の切断を分析した結果を示す図である。

【図 11】

図 11 は、pG117S4HR6GLP-1 にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。図中、下線部は GLP-1 [G] の由来のアミノ酸配列を示し、二重下線部は補助ペプチド由来のアミノ酸配列を示す。

【図 12】

図 12 は、pG117S4HompRHKR にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列を示す

図である。図中、下線部はGLP-1 [G] の由来のアミノ酸配列を示し、二重下線部は補助ペプチド由来のアミノ酸配列を示す。

【図 1 3】

図 1 3 は、pG117S4HompRHPR にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。図中、下線部はGLP-1 [G] の由来のアミノ酸配列を示し、二重下線部は補助ペプチド由来のアミノ酸配列を示す。

【図 1 4】

図 1 4 は、SPセファロースビグビーズからのRHHGP [G] の溶出パターンを示す図であり、↓は、溶出開始位置を示す。

【図 1 5】

図 1 5 は、RHHGP [G] のアミド化反応の pH 依存性を示す図である。

【図 1 6】

図 1 6 は、アミド化反応において、RHHGP [G] がRHHGL-1 に変換される経時変化をイオン交換 HPLC により測定した図であり、1 はRHHGP [G] を、2 はRHHGP-1 を示す。

分析条件は以下の通りである。

カラム ; Poros S/H 4.6mm I. D. x 50mm、

流速 ; 1.6 ml/min

溶液 A ; 30mM BR 緩衝液 pH 6.0

溶液 B ; 30mM BR 緩衝液 pH 9.0

平衡化 ; 溶液 A

溶出 ; 溶液 B 0%→100%直線 pH 勾配

【図 1 7】

図 1 7 は、RHHGP-1 を基質とした、Kex2プロテアーゼプロセッシング反応の pH 依存性を示す図である。

【図 1 8】

図 1 8 は、マクロブレップ High-S による GLP-1 精製における溶出パターン及び、形成された pH 勾配を示す図である。

【図 1 9】

図 19 は、マクロプレップ High-S による不純物の除去状況を示す図であり、A はカラムにロードした試料を、B は溶出後の分析 HPLC パターンを示し、また、1 は GLP-1 [G] を、2 は GLP-1 を示す。

【図 20】

図 20 は、OmpT による第 1 切断、Kex2 プロテアーゼによる第 2 切断を経由して、GLP-1 を製造した際の、各精製工程標品の分析 HPLC パターンをまとめて示した図である。A は OmpT 反応後、B は SPセファローズ後、C は Kex2 反応後、D はマクロプレップ High-S 後、E は PorosR2 後の逆相 HPLC パターンを示し、また、1 は GP97ompPR を、2 は保護ペプチドを、3 は RHHGP [G] を、4 は RHHGP-1 を、5 は GLP-1 を示す。

分析条件は以下の通りである。

カラム ; YMC Protein RP 4.6mm I. D. x 150mm

流速 ; 1.0 ml/min

溶液 A ; 0.1% TFA / 10% アセトニトリル

溶液 B ; 0.1% TFA / 60% アセトニトリル

平衡化 ; 溶液 A

溶出 ; 溶液 B 44% → 74% / 12 分

【図 21】

図 21 は、RHHGP [G] , RHHGP-1, GLP-1 [G] , GLP-1 溶解度の pH 依存性を示す図である。

【図 22】

図 22 は、Tween 80 による、RHHGP [G]、RHHGP-1 及び GLP-1 の凝集抑制効果を示す図であり、A は Tween 80 による RHHGP [G] 及び RHHGP-1 の凝集抑制を示し、B は Tween80 による GLP-1 凝集抑制を示す。

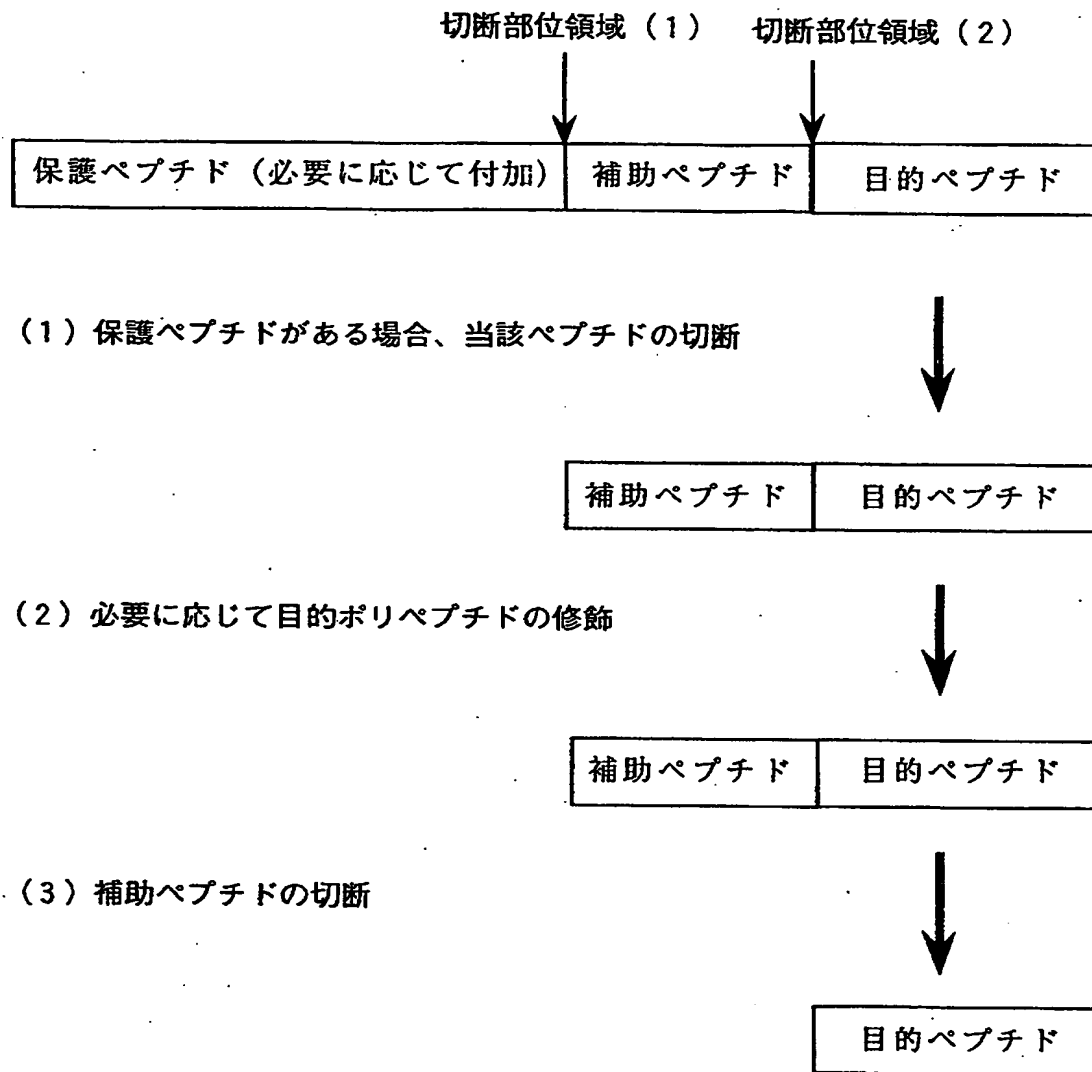
【図 23】

図 23 は、NaCl 及び温度による GLP-1 の凝集抑制効果を示す図であり、C は NaCl による GLP-1 凝集抑制を示し、D は温度による GLP-1 凝集抑制を示す。

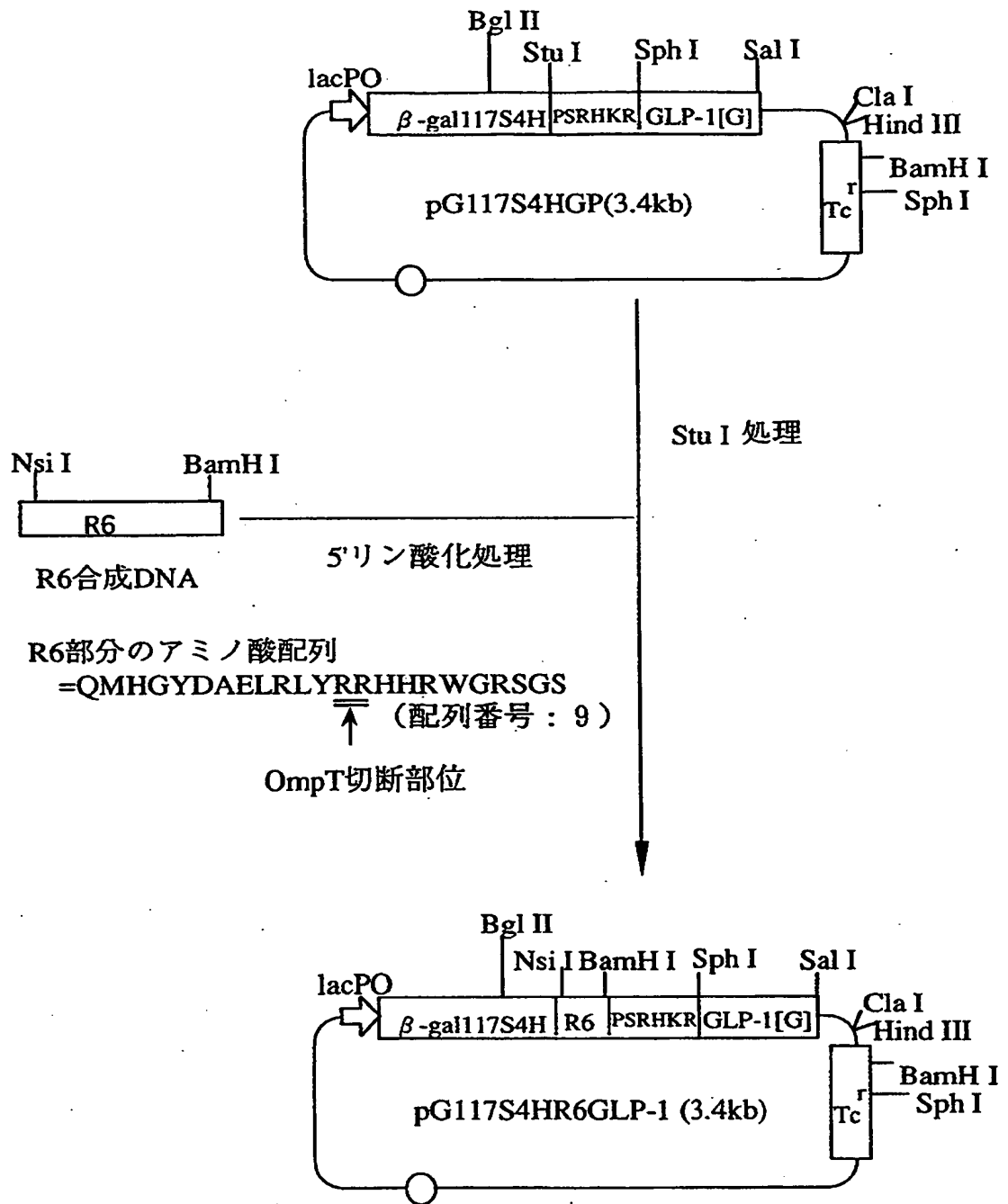
【書類名】

図面

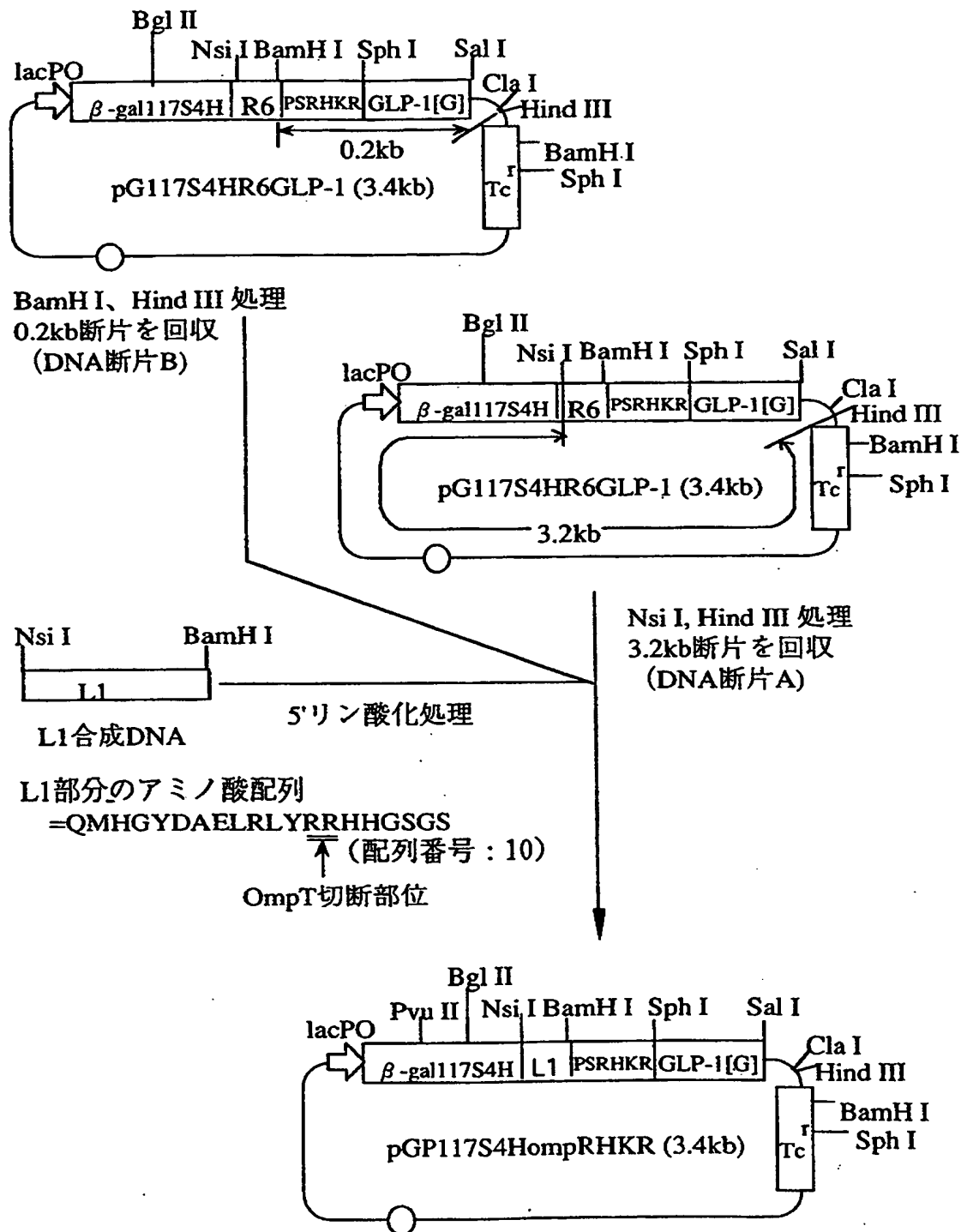
【図 1】



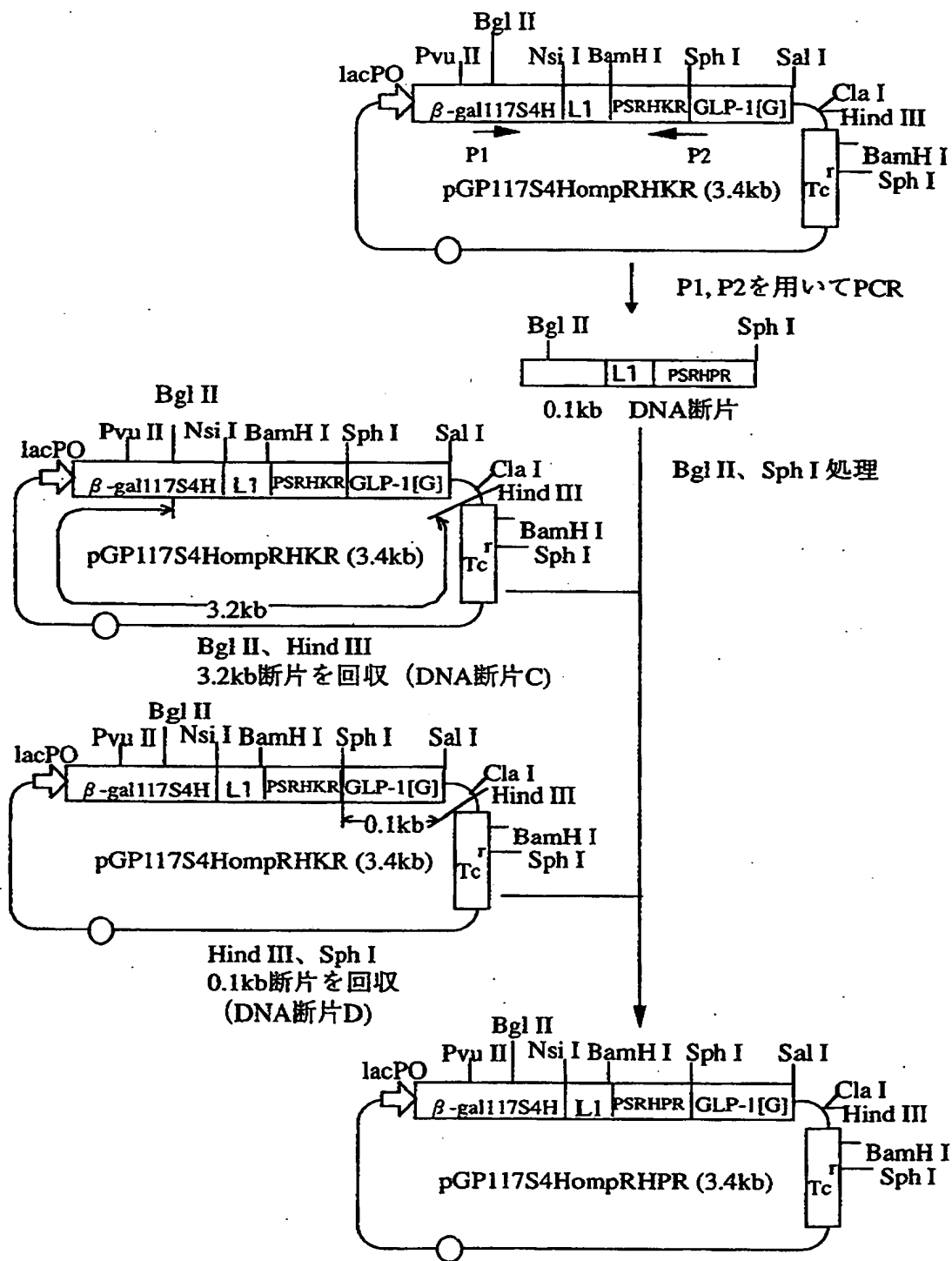
【図 2】



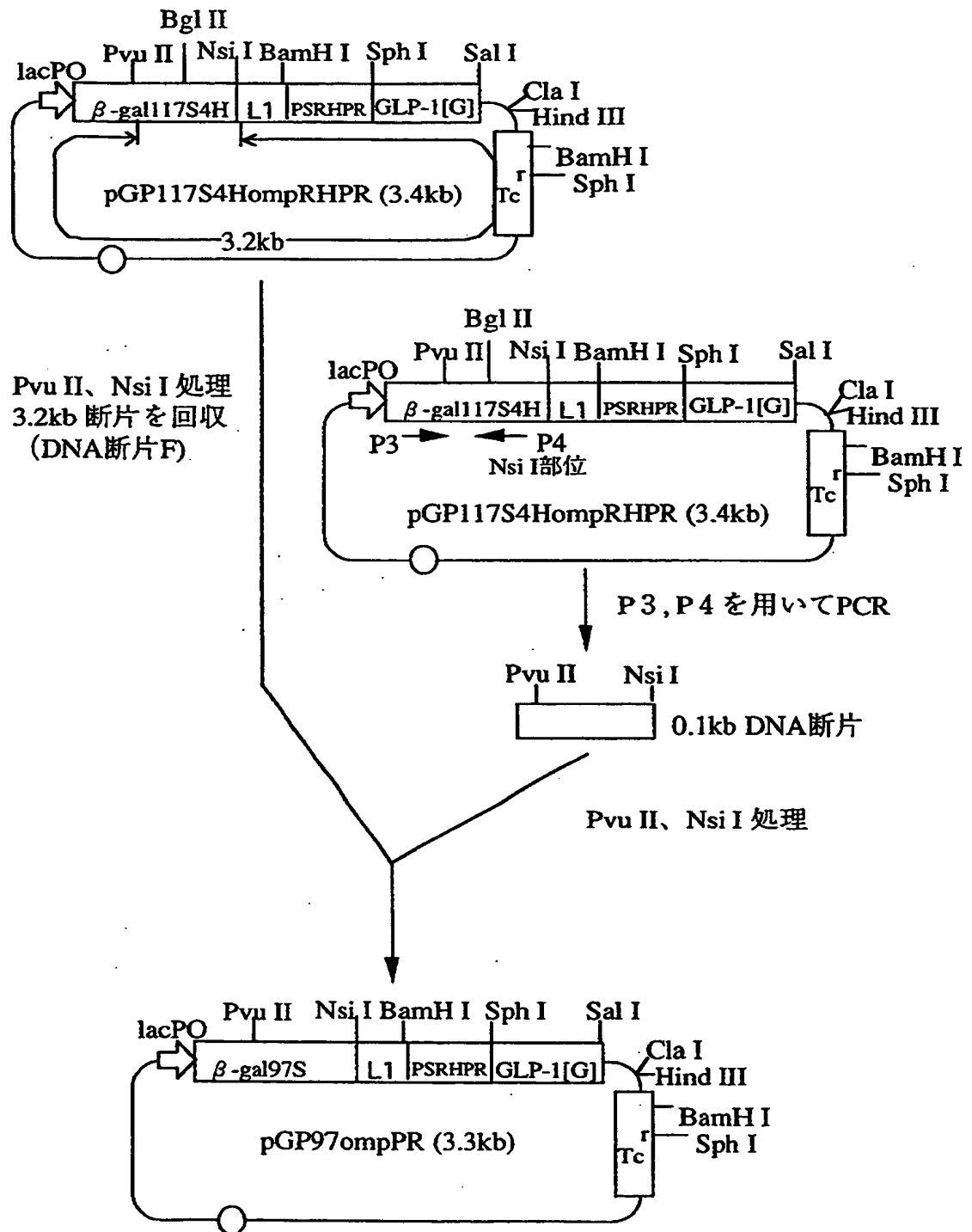
【図 3】



【図4】



【図 5】



【図 6】

R 6 の配列	5'CAG ATG CAT GGT TAT GAC GCG GAG CTC CGG CTG TAT CGC CGT CAT CAC CGG 3'GTC TAC GTA CCA ATA CTG CGC CTC GAG GCC GAC ATA GCG GCA GTA GTG GCC Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg (配列番号: 11)(配列番号: 12)
対応するアミノ酸配列	TGG GGT CGT TCC GGA TCC 3' ACC CCA GCA AGG CCT AGG 5' Trp Gly Arg Ser Gly Ser
L 1 の配列	5' TGG TTA TGA CCG GGA GCT CCG CCT GTA TCG CCG TCA TCA CGG TT 3'(配列番号13) 3'ACGTACC AAT ACT CCG CCT CGA GGC GGA CAT ACC GGC AGT AGT GCC AAG GCC 5'(配列番号14)
P 1 プライマーの配列	5'GAC TCA GAT CTT CCT GAG GCC GAT 3'(配列番号: 15)
P 2 プライマーの配列	5'AAA GGT ACC TTC CGC ATG CCG CGG ATG TCG ACA AGG 3'(配列番号: 16)
P 3 プライマーの配列	5'AGG CCA GGA ACC GTA AAA AG 3'(配列番号: 17)
P 4 プライマーの配列	5'AAA ATG CAT CGC ATC GTA ACC GTG CAT CT 3'(配列番号: 18)

【図 7】

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu	75
Glu Ser Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	105
Leu Arg Leu Tyr Arg <u>Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg</u>	120
↓	
<u>His Pro Arg</u> His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser	135
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	150
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	
154	

(配列番号 : 20)

pGP97ompPRにコードされた融合蛋白 (GP97ompPR) のアミノ酸配列

【図 8】

lac PO
 CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG

1
 GATAACAATTTACACAGGAAACAGCT ATG ACC ATG ATT ACG GAT TCA-CTG GCC
 Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala

GTC GTT TTA CAA CGT AAA GAC TGG GAT AAC CCT GGC GTT ACC CAA CTT
 Val Val Leu Gln Arg Lys Asp Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu

AAT CGC CTT GCA GCA CAT CCC CCT TTC GCC AGC TGG CGT AAT AGC GAC
 Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp

GAC GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT GGC
 Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly

GAA TGG CGC TTT GCC TGG TTT CCG GCA CCA GAA GCG GTG CCG GCA AGC
 Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser

TTG CTG GAG TCA GAT CTT CCT GAG GCC GAT ACT GTC GTC GTC CCC TCA
 Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser

AAC TGG CAG ATG CAC GGT TAC GAT GCG ATG CAT GGT TAT GAC GCG GAG
 Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Met His Gly Tyr Asp Ala Glu

CTC CGC CTG TAT CGC CGT CAT CAC GGT TCC GGA TCC CCT TCT CGA CAT
 Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His

CCG CGG CAT GCG GAA GGT ACC TTT ACC AGC GAT GTG AGC TCG TAT CTG
 Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu

GAA GGT CAG GCG GCA AAA GAA TTC ATC GCG TGG CTG GTG AAA GGC CGT
 Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

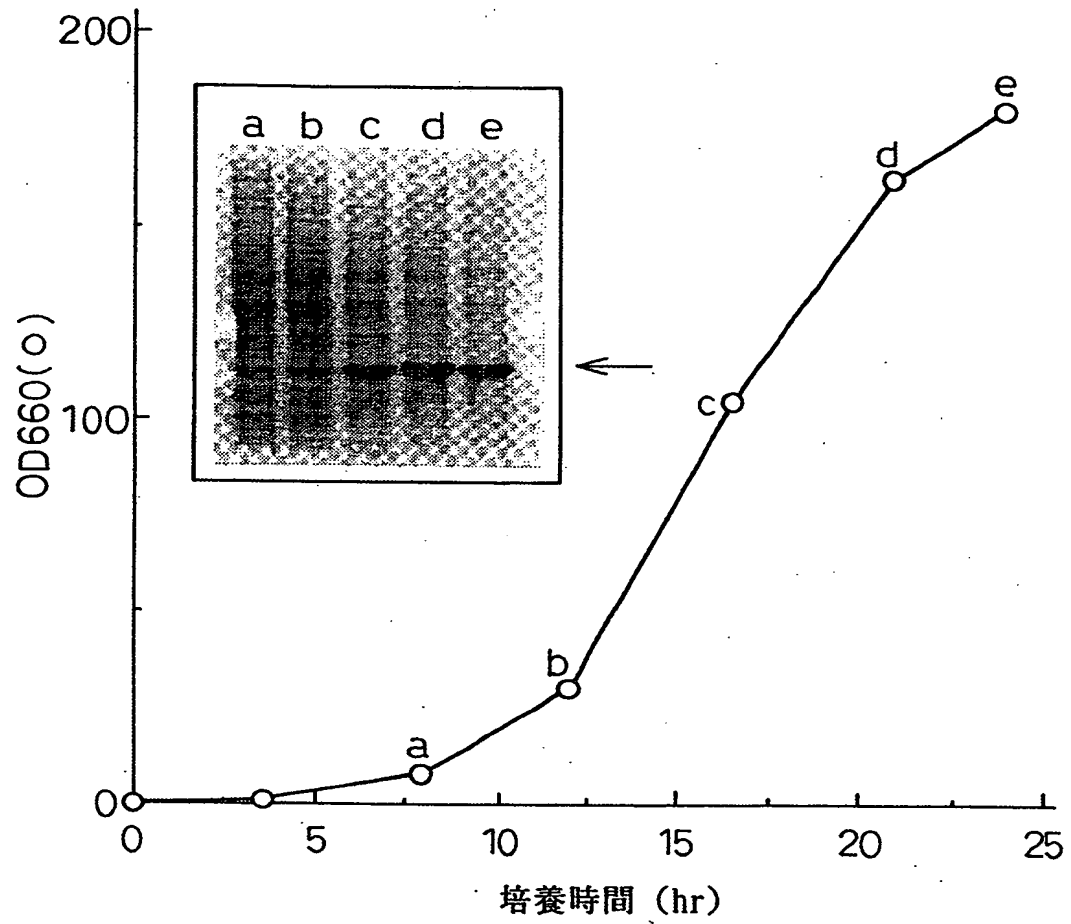
462
 GGT TAA GTCGAC AGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTCTCGGAATTAATTCTCATGT
 Gly ***
 終止コドン

TTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTA

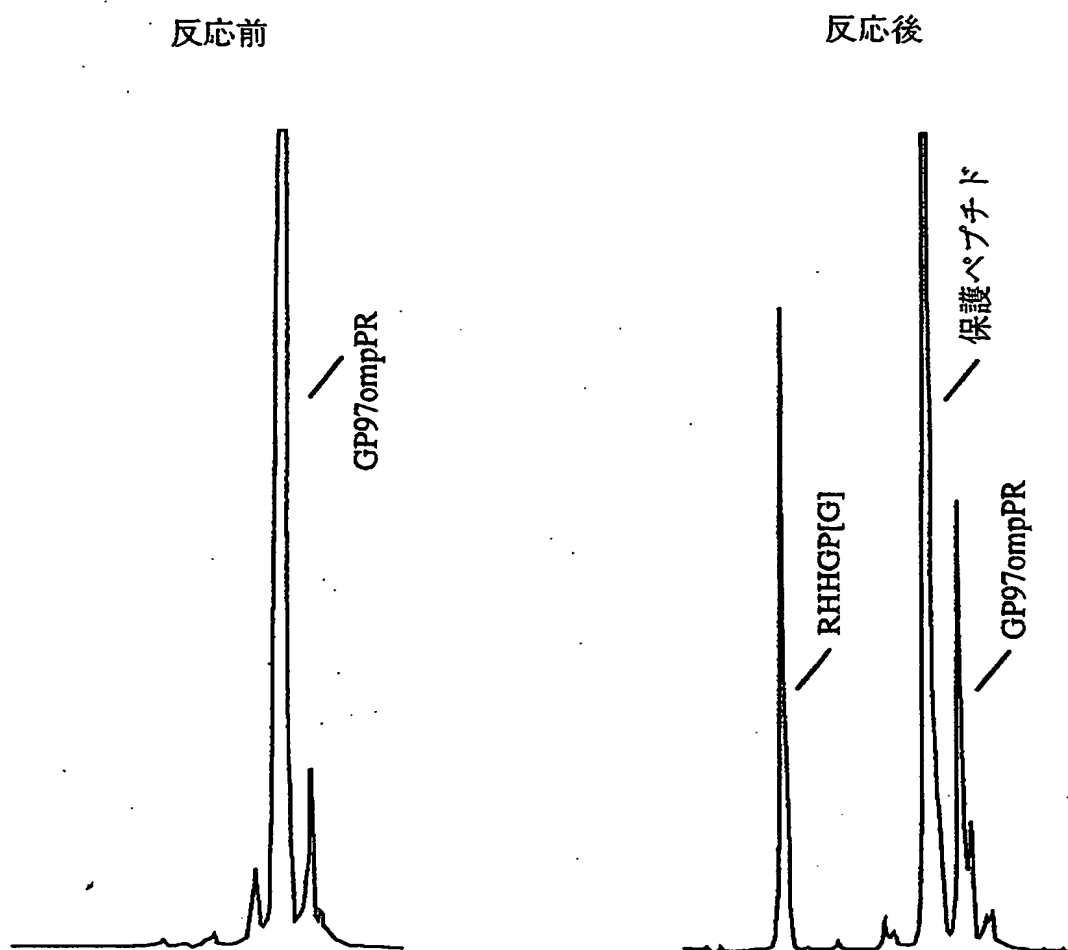
(配列番号 : 19)

【図9】

図面代用写真



【図 10】



【図11】

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu	75
Glu Ser Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His His Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr Arg <u>Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser</u>	150
<u>Pro Ser Arg His Lys Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp</u>	165
<u>Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala</u>	180
<u>Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly</u>	

(配列番号: 21)

pG117S4HR6GLP-1にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列

【図 12】

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu	75
Glu Ser Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His His Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr Arg <u>Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg</u>	150
<u>His Lys Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	

(配列番号 : 22)

pG117S4HompRHKRにコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列

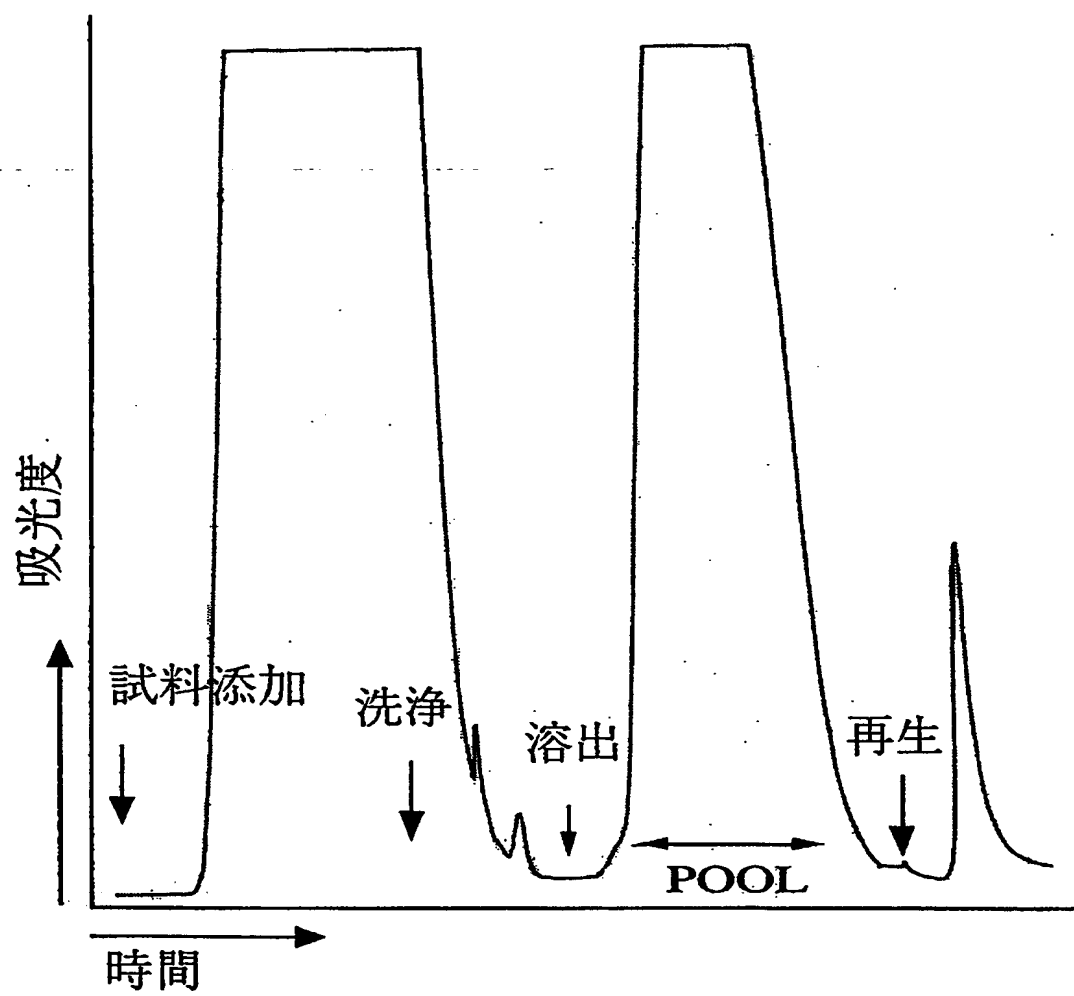
【図13】

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Asp Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Ala Ser Leu Leu	75
Glu Ser Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His His Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr Arg <u>Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg</u>	150
<u>His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	

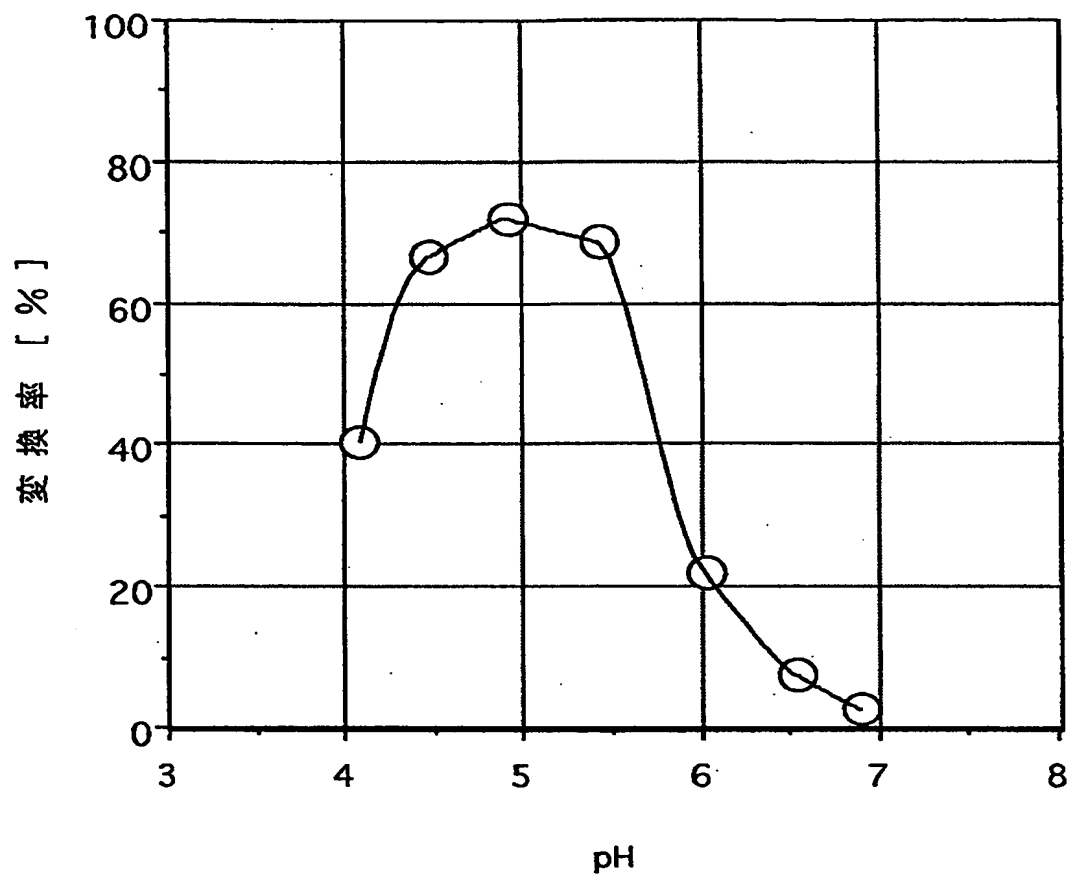
(配列番号 : 23)

pG117S4HompRHPRにコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列

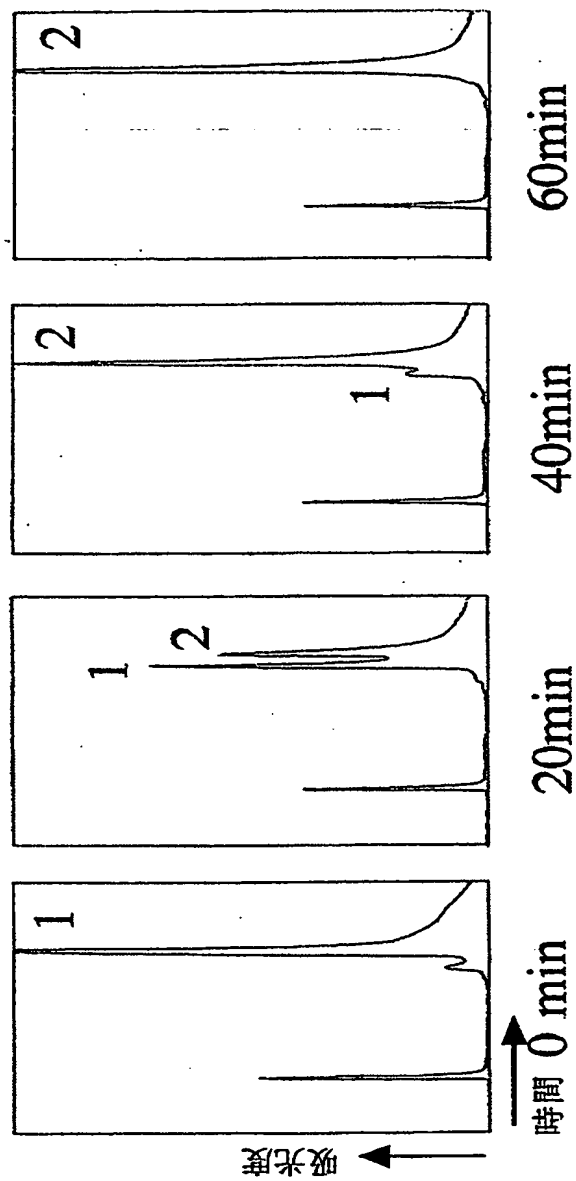
【図 14】



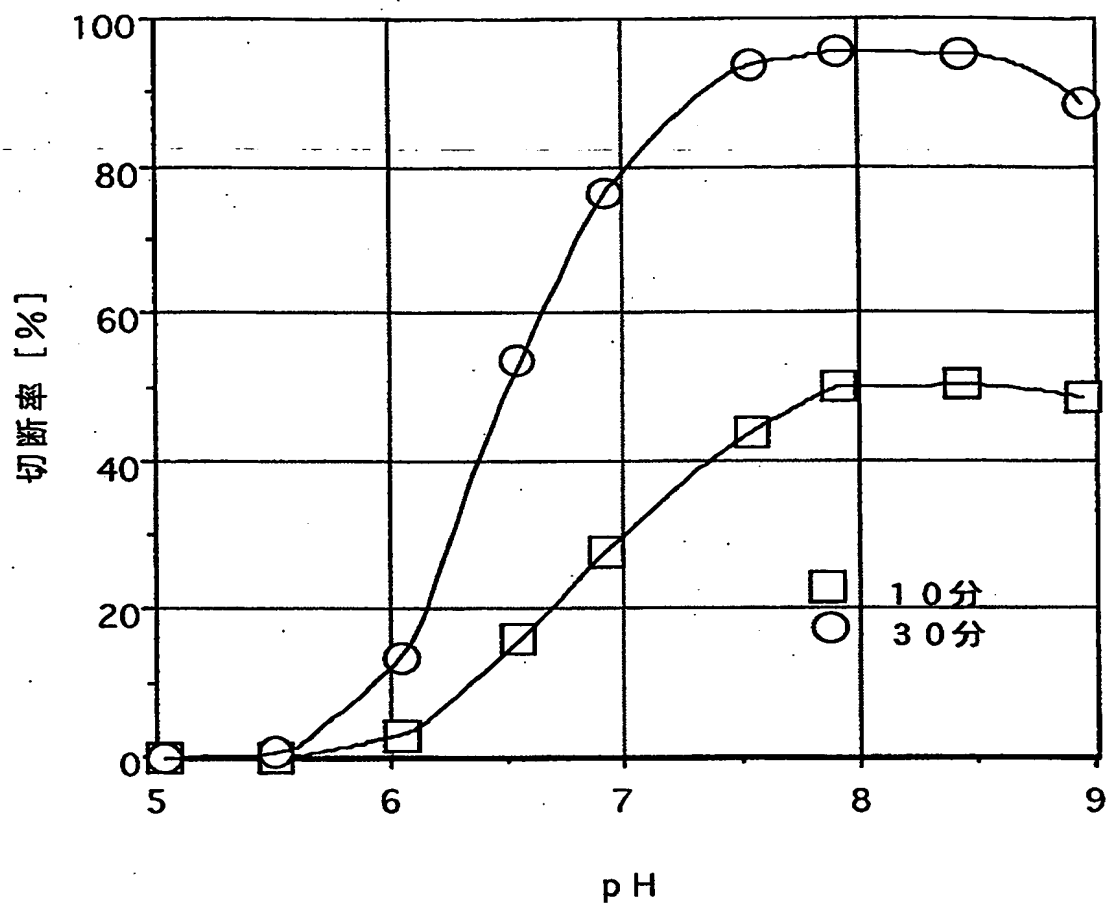
【図 15】



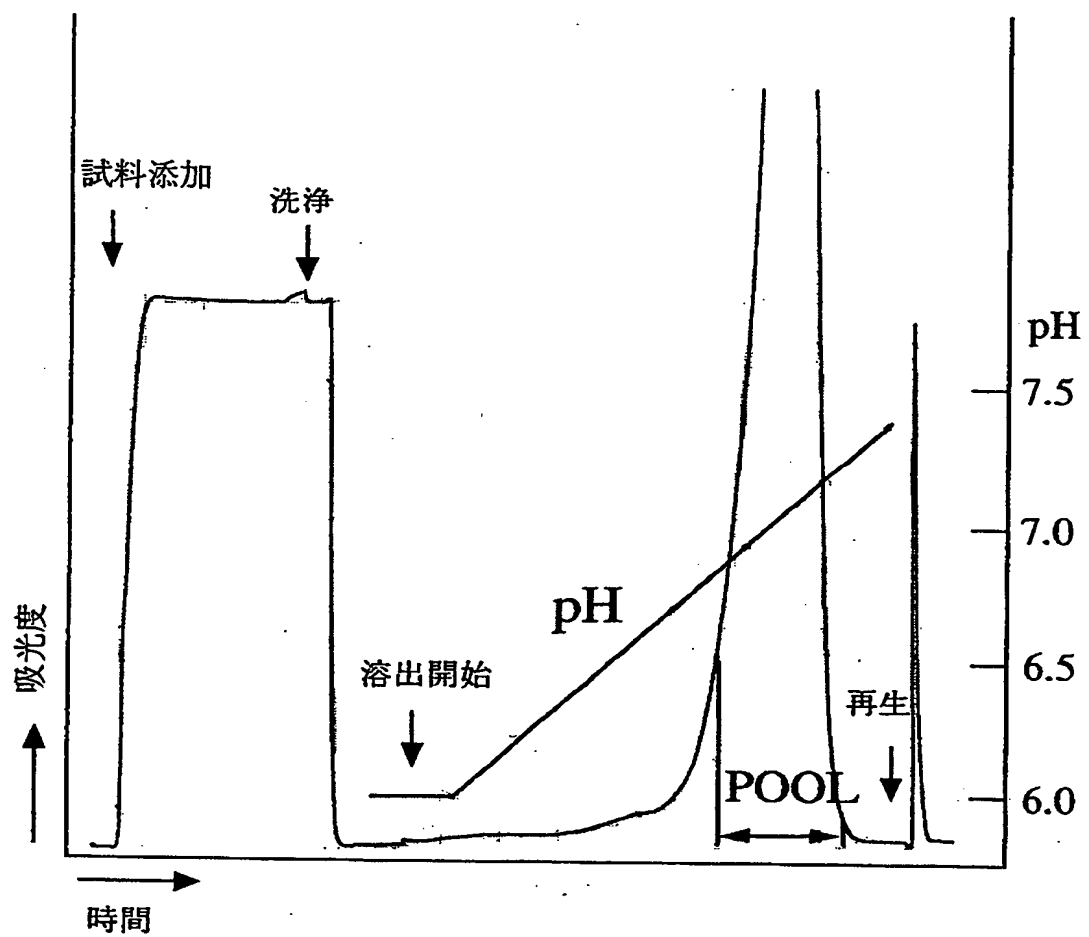
【図 16】



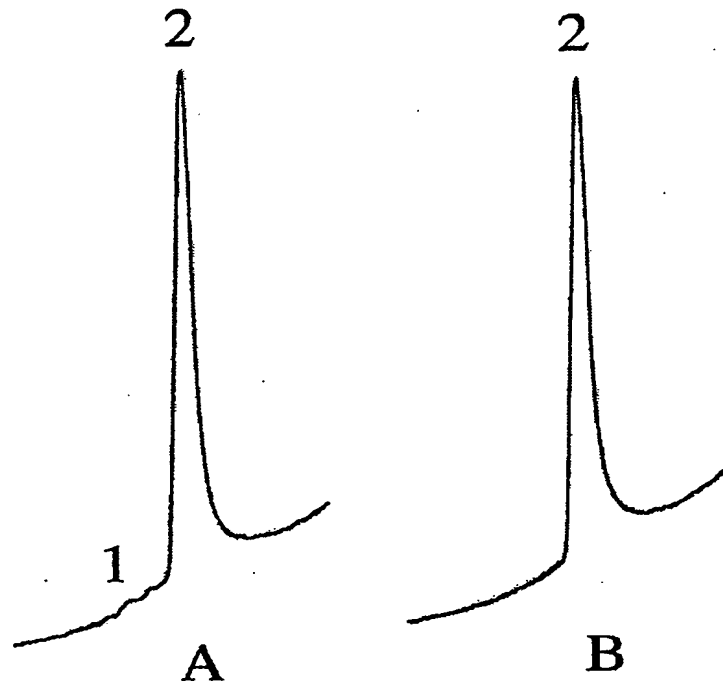
【図 17】



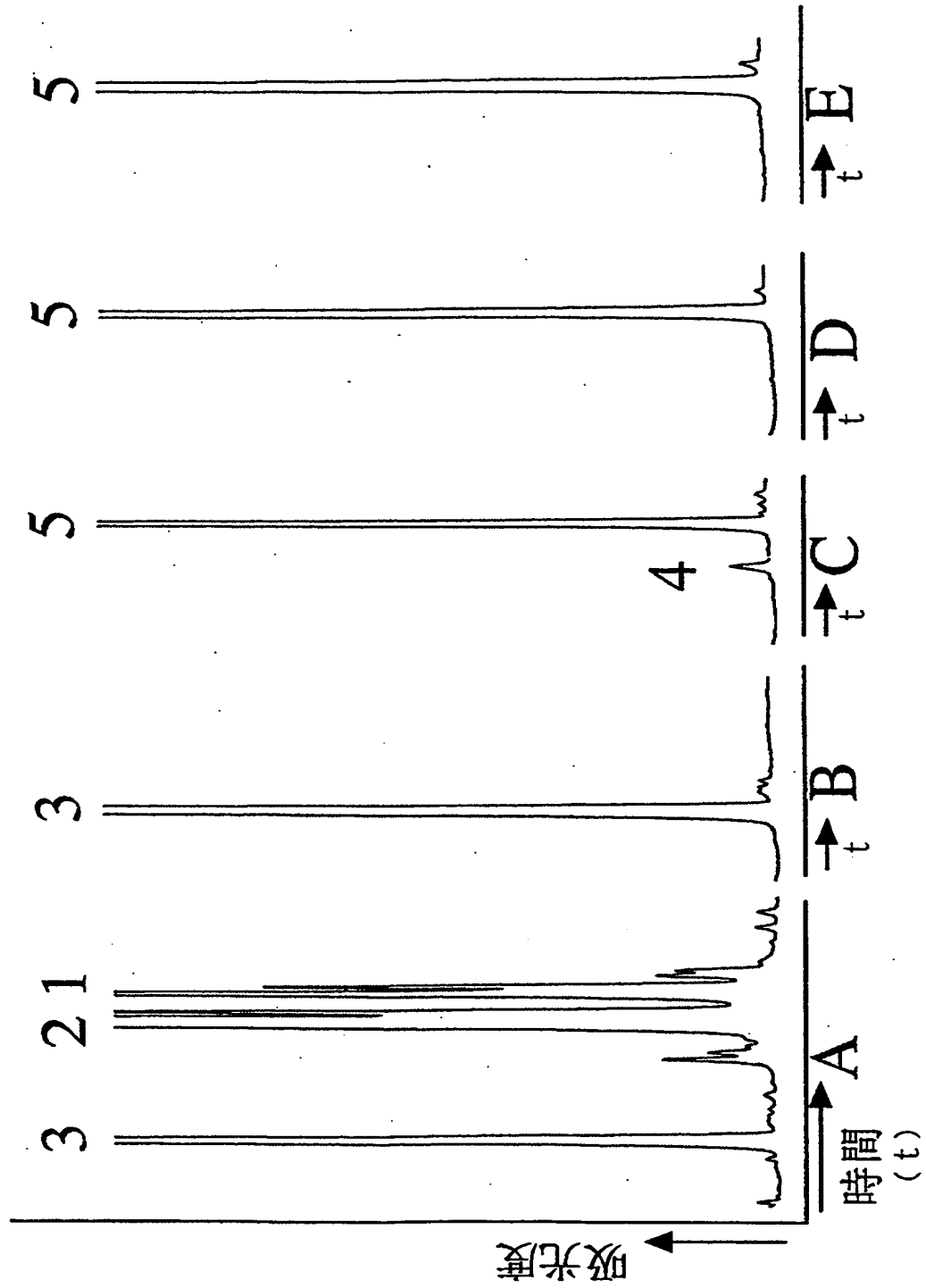
【図 18】



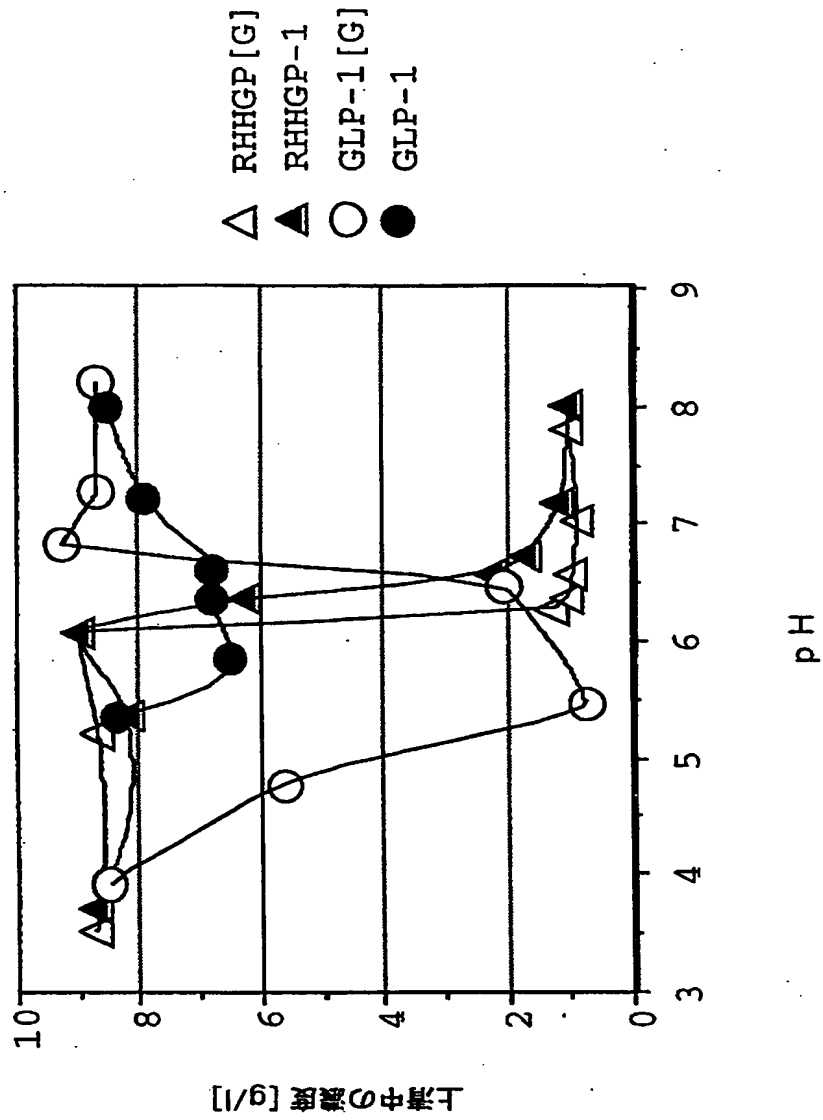
【図 19】



【図 20】

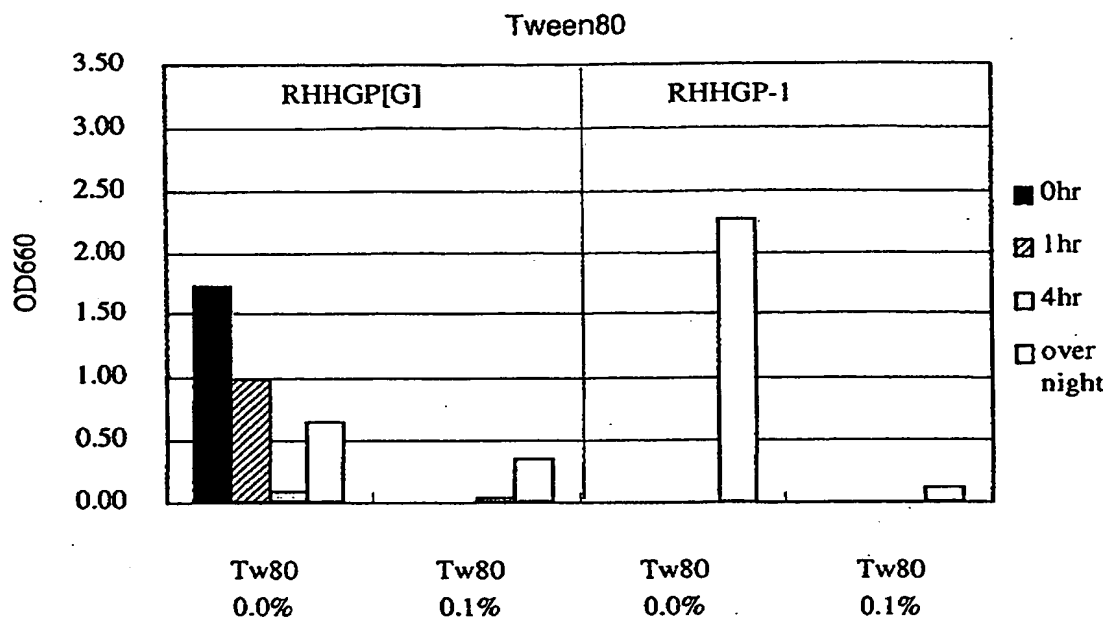


【図 21】

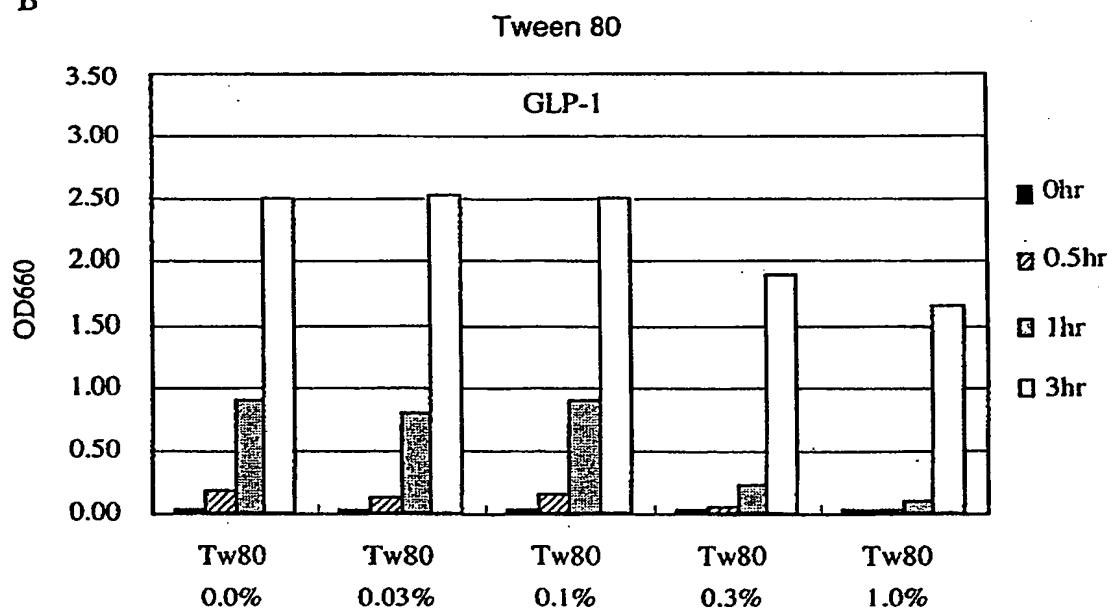


【図 22】

A

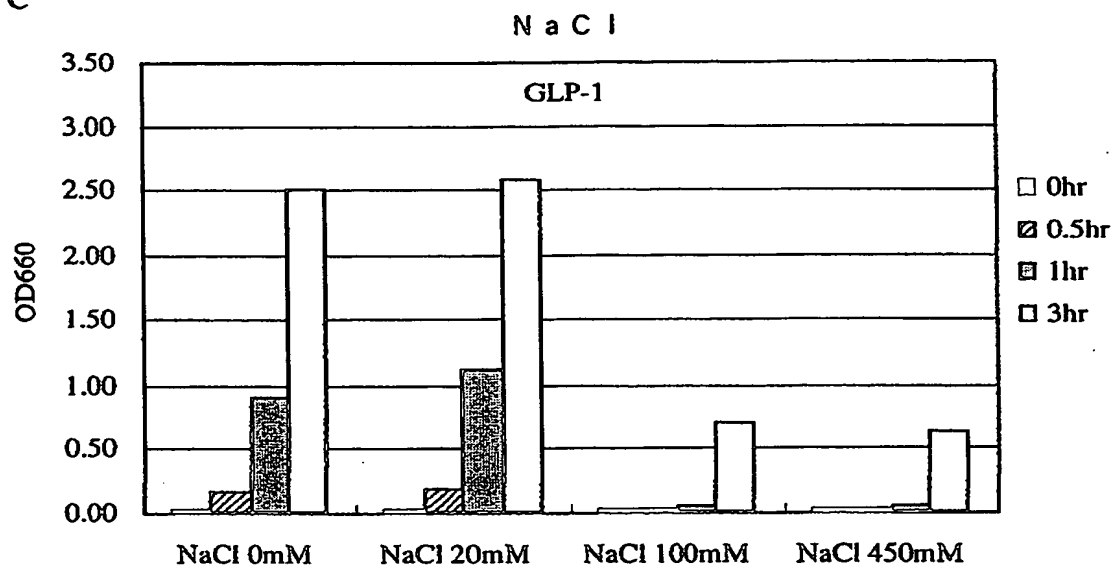


B

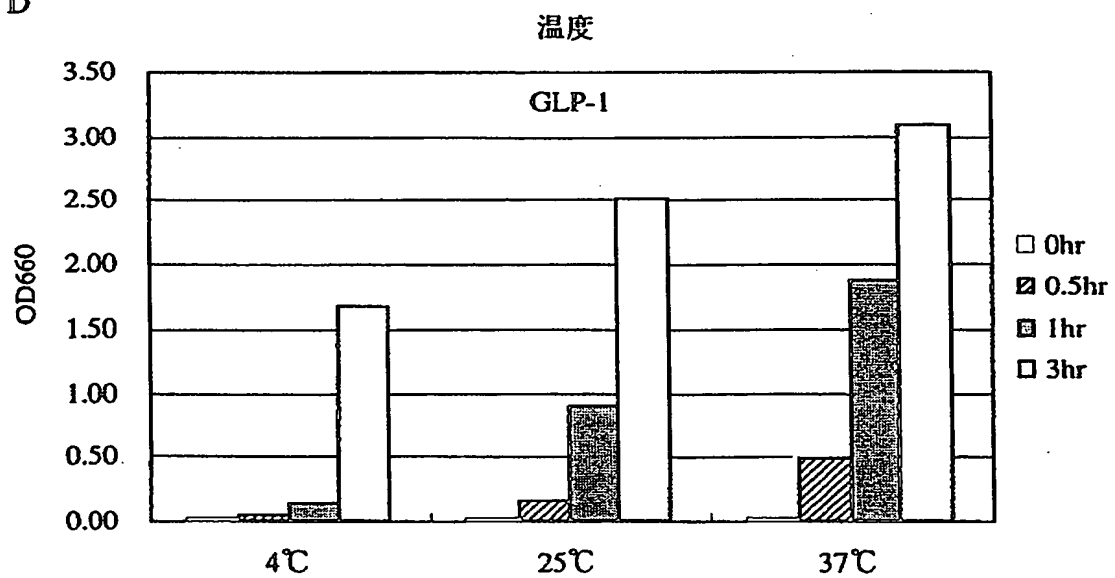


【図 23】

C



D



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ペプチドの新規な製造方法の提供。

【解決手段】 (1) 補助ペプチドが付加された目的ペプチド又はそれにさらに保護ペプチドが付加された融合蛋白質をコードする塩基配列を有する発現ベクター形質転換された細胞を培養して、当該培養物から前記補助ペプチドが付加された目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取し；(2) 工程(1)で融合蛋白質を得た場合、当該融合蛋白質から補助ペプチドが付加された目的ペプチドと保護ペプチドを切断分離し、所望によりさらに精製し；(3) 目的ペプチドに修飾が必要な場合、工程(1)又は(2)で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドに修飾反応を施し；(4) 工程(1)～(3)で得られた補助ペプチドが付加された目的ペプチドから、補助ペプチドと目的ペプチドを切断分離し、所望により精製し；並びに(5)；工程(4)で得られた目的ペプチドを精製する工程；を含んで成る方法。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001904

【住所又は居所】

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】

サントリー株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100077517

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

石田 敬

【代理人】

申請人

【識別番号】

100087871

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

福本 積

【代理人】

申請人

【識別番号】

100088269

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

戸田 利雄

【代理人】

申請人

【識別番号】

100082898

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名	サントリー株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)